

Die Rolle des VEGF-Rezeptor-1 bei der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Carsten Arne Vogel
aus Leverkusen

Gießen 2009

Aus dem
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung
W.G. Kerckhoff-Institut
in Bad Nauheim
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. T. Braun

Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper

Gutachter: Frau PD Dr. K. S. Lips

Tag der Disputation: 25.03.2010

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Historischer Hintergrund.....	1
1.2 VEGF-Isoformen.....	3
1.3 Regulation der VEGF-Expression	5
1.4 VEGF-induzierbare Signaltransduktionswege	7
1.5 Biologische Aktivität von VEGF.....	10
1.5.1 Mitogenese, Angiogenese, Wirkung als Überlebensfaktor.....	10
1.5.2 Effekte auf Knochenmarkszellen	11
1.5.3 Erhöhung der vaskulären Permeabilität	12
1.6 VEGF-Rezeptoren.....	14
1.6.1 VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1).....	16
1.6.2 VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1).....	18
1.6.3 VEGF-Rezeptor-3 (Flt-4).....	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Methoden	21
2.1 Zellkultur	21
2.1.1 Kultivierung der Zellen.....	21
2.1.2 Passagieren der Zellen.....	21
2.1.3 Einfrieren, Lagerung und Auftauen der Zellen	22
2.1.4 Zellzahlbestimmung.....	22
2.1.3 Konstanz und Reproduzierbarkeit in der Zellkultur.....	23
2.2 Verwendete Primärzellkulturen	23
2.2.1 Choroidplexus Epithelzellen vom Schwein (CPE)	23
2.2.2 Mikrovaskuläre Gehirndothelzellen vom Schwein (BMEC)	25
2.3 Verwendete Zelllinien: CSG und MDCK	27
2.4 Das <i>in vitro</i>-Hypoxiemodell	27
2.5 Permeabilitätsmessung	28
2.5.1 Aufbau des <i>in vitro</i> Permeabilitätsmodells	28
2.5.2 Durchführung der Permeabilitätsmessung	29

2.6	Proliferationsmessung	31
2.6.1	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	31
2.6.2	[³ H]-Thymidin-Inkorporation.....	32
2.7	Zytotoxizitätsmessung	33
2.8	Molekularbiologische Untersuchungen.....	34
2.8.1	Isolierung von Total-RNA	35
2.8.2	mRNA-Isolierung mit Dynabeads [®] Oligo (dT) ₂₅	36
2.8.3	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	37
2.8.4	DNA-Gelelektrophorese	39
2.8.5	Elution aus dem Agarosegel.....	40
2.8.6	Einbau der PCR-Produkte in einen Vektor	40
2.8.7	Transformation von Bakterien	41
2.8.8	Blau-Weiß-Differenzierung	41
2.8.9	Plasmidpräparation.....	42
2.8.10	Anlegen von Glycerinstocks der Bakterienklone.....	42
2.8.11	Restriktionsverdau	42
2.8.12	DNA-Sequenzierung nach Sanger	42
2.8.13	Northern Blot	43
2.8.14	³² P-Markierung von cDNA-Sonden	45
2.8.15	Hybridisierung mit cDNA-Sonden	46
2.8.16	Strippen der Northern blots.....	46
2.9	Proteinanalyse	47
2.9.1	Proteinisolierung aus Zellen.....	47
2.9.2	Bestimmung des Proteingehalts	47
2.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
2.9.4	Western Blot	48
2.9.5	Ponceaufärbung.....	49
2.9.6	Spezifische Immunreaktion und ECL-Detektion.....	50
2.9.7	Strippen der Western Blots	51
2.10	Immunzytochemie.....	51
2.10.1	Bindung des 1. und 2. Antikörpers	52
2.10.2	Kernfärbung	52
2.10.3	Eindeckeln der Präparate	52
2.10.4	Fluoreszenzmikroskopie	53
2.10.5	Kontrollpräparate	53
2.11	Statistik	53

3. Ergebnisse.....	54
3.1 Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität an Endothelzellen .	54
3.2 Charakterisierung der CPE-Zellen	58
3.3 Nachweis der VEGF-Rezeptoren in Epithelzellen	60
3.3.1 mRNA Expression der VEGF-Rezeptoren in Epithelzellen	60
3.3.1.1 Reverse Transkription–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	60
3.3.1.2 Sequenzierung der PCR-Produkte.....	61
3.3.1.3 Northern Blot	63
3.3.2 Proteinexpression der VEGF-Rezeptoren in Epithelzellen.....	64
3.3.2.1 Western Blot	64
3.3.2.2 Immunzytochemische Färbung	65
3.4 Widerstandswerte der verwendeten Epithelzellen.....	69
3.5 Mechanismus der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität	70
3.5.1 Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität an Endothelzellen	70
3.5.2 VEGF-/ PlGF-induzierte Hyperpermeabilität	73
3.5.4 Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität erfolgt durch Aktivierung des PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweges	76
3.6 Zytotoxizitätstest.....	80
3.7 VEGF-induzierte Proliferation	82
3.7.1 [³ H]-Thymidin-Inkorporation.....	82
3.7.2 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	82
4. Diskussion	85
5. Zusammenfassung	95
6. Summary.....	97
7. Literaturverzeichnis.....	99
8. Anhang.....	118
8.1 Verwendete Materialien	122
8.2 Abkürzungsverzeichnis	130
9. Danksagung.....	128
10. Curriculum vitae	129

1. Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund

Bereits vor über einem Jahrhundert wurde beobachtet, dass Tumorwachstum von einer gesteigerten Vaskularisierung des Gewebes begleitet sein kann. Schon 1939 beschrieben Ide et al. eine vermehrte Neovaskularisierung nach Transplantation von Tumoren und postulierten daraufhin die Existenz eines Tumor-begleitenden Gefäßwachstumsfaktor. Dieser Faktor sei für die Versorgung des wachsenden Tumors mit Nährstoffen verantwortlich¹. 1945 entwickelten Algire et al. dieses Konzept weiter und vermuteten, dass die gesteigerte Kapillarproliferation, ausgelöst durch Tumorzellen, durch Chromatin-Abbauprodukte, denen man zu dieser Zeit eine starke wachstumsfördernde Potenz zusprach, induziert wird². Michaelson postulierte 1948, dass ein diffusionsfähiger angiogener „Faktor X“, produziert durch die Retinazellen, verantwortlich für die Neovaskularisierung der Retina und der Iris im Rahmen der proliferativen diabetischen Retinopathie ist³.

Der Nachweis eines durch Tumore produzierten löslichen angiogen wirksamen Faktors gelang 1968. Greenblatt und Shubik⁴ sowie Ehrmann und Knoth⁵ zeigten, dass die Transplantation von Melanom- oder Chorion-Karzinom Zellen eine Gefäßproliferation anregen, auch wenn die Tumorzellen durch Millipore Filter vom Gewebe getrennt sind.

Judah Folkman gelang 1970 die Isolierung eines Faktors aus Tumorgewebe, welchen er als verantwortlich für die Gefäßneubildung hielt⁶. 1983 beschrieben Senger et al. die unvollständige Aufreinigung eines Proteins aus einer Hepatokarzinom-Zelllinie des Meerschweinchens, welches nach Injektion in die Haut eine erhöhte Gefäßpermeabilität förderte, und zwar mit einer 50.000-mal höheren Potenz als Histamin. Diesem Protein wurde der Name „vascular permeability factor“ (VPF) gegeben⁷. Bis heute ist VPF einer der potentesten gefäßpermeabilisierenden Wirkstoffe.

Im Juni 1989 beschrieben Ferrara und Henzel die Isolation eines diffusionsfähigen Endothel-spezifischen Mitogens aus einem aufbereiteten Medium boviner hypophysärer follikulärer Zellen⁸. Sie nannten es, die eingeschränkte Zielzellspezifität dieses Moleküls widerspiegelnd, „vascular endothelial growth factor“ (VEGF). Anschließend berichteten Connolly et al. 1989 von der Isolation und Sequenzierung des humanen VPF aus einer Hepatokarzinom-Zelllinie⁹. Im Dezember 1989 entschlüsselten dann beide

Arbeitsgruppen die kompletten DNA-Sequenzen, die VEGF und VPF kodierten^{10,11}. Im Vergleich stellte sich dann heraus, dass es sich bei den zwei Faktoren um ein und dasselbe Molekül handelte¹².

Inzwischen ist VEGF das Ziel umfangreicher wissenschaftlicher Forschung. Wurden bis zum Jahr 2000 insgesamt 4322 Artikel zum Thema VEGF veröffentlicht, so waren es in den Jahren 2001 bis 2008 schon 20980 Artikel (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, Suchbegriff: „VEGF“).

Auf Grund seiner vielfältigen Effekte nimmt VEGF eine zentrale Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen ein. Durch die Erkenntnisse der Forschung erhofft man sich in vielen Fachdisziplinen neue Therapieoptionen. So sieht man zum Beispiel in der „therapeutischen Angiogenese“ eine Möglichkeit der Therapie von Myokardischämie oder Traumata. Weiterhin wird die VEGF-induzierte Hyperpermeabilität für die Entstehung des vasogenen Hirnödems in Folge von Hypoxie (z.B. Höhenkrankheit) und Ischämie (z.B. Apoplex) verantwortlich gemacht. Eine Inhibition könnte hier eine mögliche Therapie darstellen. In der Tumorforschung erwartet man durch die Blockade von VEGF und seiner Signaltransduktion eine Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten multipler solider und hämatologischer Malignome. Seit dem Frühjahr 2005 ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab, Avastin[®], *Hoffman-La Roche, CH*) in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms, des inoperablen Bronchialkarzinoms, des Mammakarzinoms sowie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen. In Rahmen von Studien wird Avastin[®] in Frankreich zur Behandlung des fortgeschrittenen Mamma- und Harnblasenkarzinoms eingesetzt.

Trotz der umfangreichen Forschung sind viele Aspekte der VEGF-Wirkungsweise bis jetzt nicht abschließend geklärt und werden zum Teil kontrovers diskutiert. Insbesondere die Frage nach der Beteiligung der unterschiedlichen Rezeptoren in der Signalvermittlung gibt immer wieder Anlass wissenschaftlicher Diskussionen.

1.2 VEGF-Isoformen

VEGF ist ein Homodimer, welches aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 23 kDa besteht. Die Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das Molekül gehört in die Gruppe der Glykoproteine¹³.

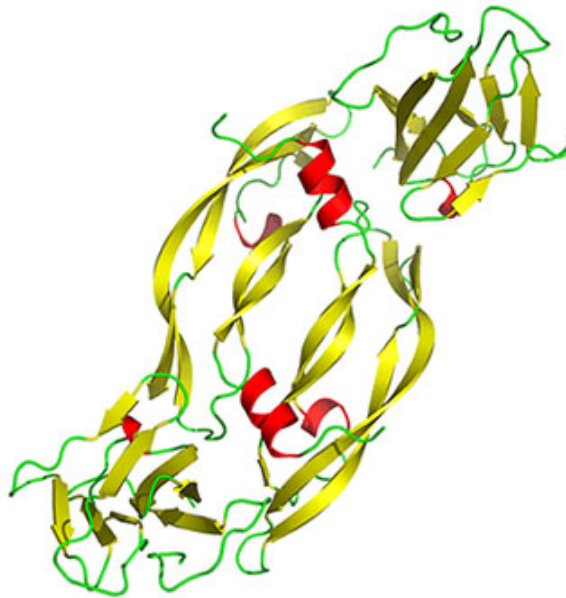


Abbildung 1: Proteinstruktur des VEGF-Homodimer. Die Disulfidbrücken sind rot markiert. (Quelle: Berman et al, 2000 ¹⁴)

Zu der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren zählen VEGF-A, häufig nur als VEGF bezeichnet, VEGF-B, VEGF-C/VRP (VEGF-related protein), VEGF-D sowie der Plazenta-Wachstumsfaktor PlGF. Sie gehören der VEGF/PDGF (platelet derived growth factor) Supergen Familie an.

Die Subtypen VEGF-A, VEGF-B und PlGF sind vorwiegend Effektoren an vaskulären Endothelzellen, während VEGF-C und VEGF-D die lymphatische Angiogenese regulieren¹⁵.

Das menschliche VEGF (VEGF-A) Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert¹⁶, die Kodierungsregion umfasst etwa 14 kb. Es ist in acht Exons organisiert, die von sieben Introns separiert werden. Während die VEGF mRNA immer die Exons 1 bis 5 und Exon 8 beinhaltet, können durch alternatives Spleißen der Exons 6 und 7 unterschiedliche VEGF-Isoformen synthetisiert werden¹⁷. Gegenwärtig sind acht verschiedene Isoformen bekannt, welche sich in der Länge der Polypeptidketten

unterscheiden. Entsprechend der Anzahl der Aminosäuren werden sie als VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ bezeichnet.

VEGF₁₂₁ fehlen die kodierenden Abschnitte von Exon 6A, 6B und 7 vollständig, VEGF₁₆₅ beinhaltet die in Exon 7 kodierte Sequenz und VEGF₁₄₈ hat die gleiche Aminosäuresequenz wie VEGF₁₆₅, ausgenommen einer durch 35 bp am Ende von Exon 7 kodierten Sequenz. VEGF₁₈₉ beinhaltet Exon 6A und 7, wohingegen VEGF₁₈₃ die letzten 18 bp von Exon 6A (6A2) fehlen. VEGF₂₀₆ ist die vollständige Form, sie beinhaltet neben Exon 6A und 7 eine 51 bp lange Sequenz von Intron 3, entsprechend seiner Nähe zu Exon 6A wird es auch als Exon 6B bezeichnet^{18,19,20,21,22} (Abbildung 2).

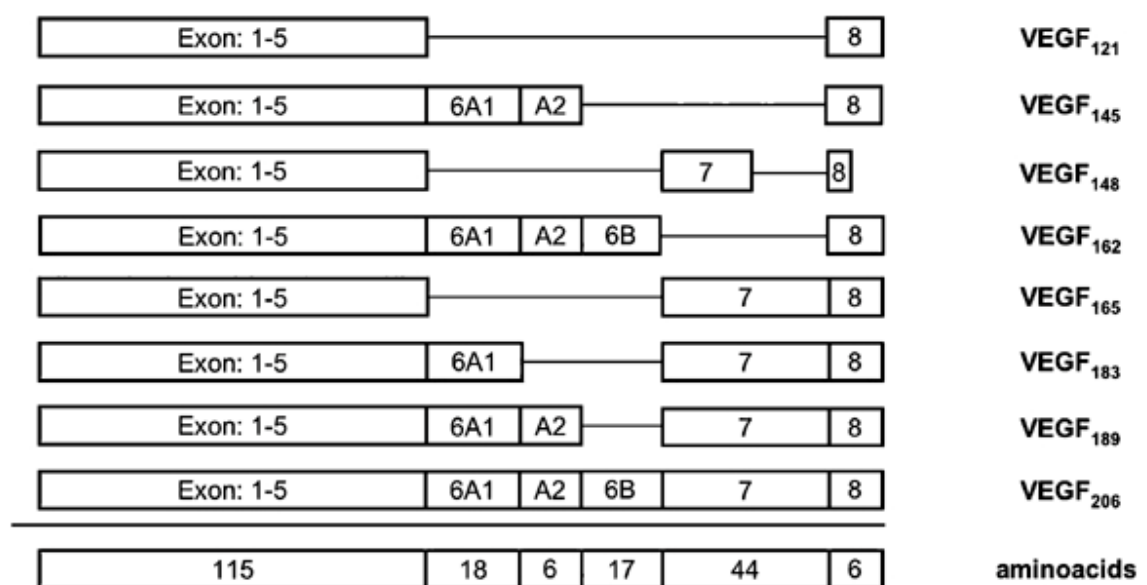


Abbildung 2: Schematische Darstellung der VEGF-Isoformen. (Quelle: Eming und Krieg, 2006²³)

Die VEGF-Isoformen unterscheiden sich in ihren Heparin-Bindungseigenschaften, der Bildung von Heparansulfat-Proteoglycanen sowie in ihrer Rezeptoraffinität²⁴. Ihre exakte biologische Funktion ist bisher nicht abschließend geklärt.

VEGF₁₂₁ ist ein saures nicht-Heparin-bindendes Polypeptid, das sezerniert wird. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind basische Polypeptide, die eine sehr hohe Affinität zu Heparin haben und nahezu vollständig an Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) gebunden sind. VEGF₁₆₅ nimmt eine Zwischenstellung ein. Es wird sezerniert, ein erheblicher Anteil ist jedoch auch an Proteine der EZM gebunden. Die an die EZM-Proteine gebundenen Isoformen können durch Heparin oder die Heparinase aus ihrer Bindung verdrängt werden und zusätzlich kann durch Plasmin-Spaltung im Bereich des

COOH-Terminus ein bioaktives Fragment, bestehend aus den ersten 110 NH₂-terminalen Aminosäuren, gebildet werden^{25,26}. Dies lässt vermuten, dass die EZM-gebundenen Isoformen eine wichtige Rolle bei der lokalen Bioverfügbarkeit und Aktivität im Rahmen der physiologischen und pathophysiologischen Angiogenese einnehmen²⁷.

Die meisten VEGF produzierenden Zellarten exprimieren die Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉. Die anderen Isoformen kommen deutlich seltener vor.

1.3 Regulation der VEGF-Expression

Viele Wachstumsfaktoren induzieren eine erhöhte Expression der VEGF-mRNA, wie beispielsweise der Epidermal Growth Factor (EGF), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)²⁴, Transforming Growth Factor β (TGF- β)²⁸, Keratinocyte Growth Factor (KGF)²⁹, Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)³⁰, Fibroblast Growth Factor (FGF-4)³¹ und Platelet-derived Growth Factor (PDGF)³². Darüber hinaus induzieren inflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 β (IL-1 β) und IL-6 die Expression von VEGF in Übereinstimmung mit der These, dass VEGF ein Mediator der Angiogenese bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen sei^{33,34}. Andere Zytokine wie IL-10 und IL-13 hingegen hemmen die Freisetzung von VEGF.

Hormone sind ebenfalls wichtige Regulatoren der VEGF-Genexpression. So steigert das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) die Sekretion von VEGF in Schilddrüsenkarzinomzellen³⁵. Auch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) und die Gonadotropine sind als Induktoren der VEGF-Genexpression bekannt³⁶. Letztere stimulieren die VEGF-Expression in Ovarien *in vitro* und *in vivo*^{37,38}.

Neben der Regulation durch verschiedene Zytokine kommt der Hypoxie eine besondere Bedeutung der transkriptionell regulierten VEGF-Expression zu. So ist die Hypoxie der maßgebliche Induktor für die Genexpression von VEGF unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen^{39,40}. Die Regulation der VEGF-Genexpression zeigt dabei Ähnlichkeiten mit der von Erythropoetin (Epo)⁴¹.

Eine zentrale Rolle der Regulation der Hypoxie-induzierten VEGF-Expression nimmt dabei der Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) ein⁴². HIF-1 ist ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, das

zuerst als Mediator der Hypoxie-induzierten Erythropoetin-Expression entdeckt wurde. Beide HIF-1 Untereinheiten gehören der Familie der basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren mit PAS-domain-Proteinen an⁴³. Nach Bildung des Heterodimers bindet HIF-1 an die spezifischen Erkennungssequenzen im Genom, den Hypoxia-Response-Elements (HRE), die als Enhancer die Transkriptionsaktivität verstärken können⁴⁴. Während die HIF-1 β -Untereinheit ein konstitutiv exprimiertes nukleäres Protein ist, unterliegt die Aktivität der HIF-1 α -Untereinheit einer vielschichtigen Regulation. Sie stellt somit den kontrollierenden Faktor dar⁴⁵.

Unter normoxischen Bedingungen ist die α -Untereinheit an zwei spezifischen Prolyl-Resten hydroxyliert⁴⁶. Diese Hydroxylierung, katalysiert durch die HIF Prolyl-Hydroxylasen⁴⁷, führt dazu, dass HIF-1 α mit dem von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase Komplex interagiert und so für die proteosomale Degradation markiert wird^{48,49}. Durch die β -Hydroxylierung eines Asparagin-Restes von HIF-1 α durch die HIF Asparaginyl Hydroxylase (factor inhibiting HIF, FIH) resultiert eine Blockierung der Interaktion von HIF-1 α mit dem Co-Aktivator der Transkription p300, dies führt wiederum zu einer Verminderung der Transkriptionsaktivität von HIF-1 α ^{50,51}. Beide Formen der HIF-1 α -Hydroxylasen sind in ihrer Aktivität sauerstoffabhängig und somit unter hypoxischen Bedingungen vermindert wirksam. Hierdurch kommt es dann durch verminderten proteolytischen Abbau und verminderte Hemmung der Transkriptionsaktivität letztlich zur gesteigerten VEGF-Genexpression.

Weiterhin wird unter normoxischen Bedingungen die Bindungsstelle von HIF-1 an den HRE durch verschiedene Faktoren wie dem Activating-Transcription-Factor (ATF) besetzt, um so in Abwesenheit von HIF-1 eine Methylierung zu verhindern^{48,52}.

Daneben wird die Aktivität von HIF-1 α auch durch den PI3-K/Akt-Signalweg unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck beeinflusst. So zeigten Zundel et al., dass eine Aktivierung von PI3-K/Akt durch Verlust des Tumor Suppressorgens PTEN zur vermehrten Stabilität und Aktivität von HIF-1 α und damit letztlich zur gesteigerten VEGF-Genexpression führt⁵³.

1.4 VEGF-induzierbare Signaltransduktionswege

VEGF vermittelt seine vielfältigen biologischen Effekte durch Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege. Dabei kommt es zunächst durch Bindung von VEGF an seine spezifischen Membranrezeptoren und deren Dimerisierung zur Autophosphorylierung und damit zur Konformationsänderung der zytosolischen Domäne. Hierdurch werden verschiedene intrazelluläre Kinasen aktiviert, die dann wiederum die Signalkaskaden stimulieren können⁵⁴. Eine Signalkaskade kann dabei unterschiedliche zelluläre Funktionen modulieren, umgekehrt kann aber auch eine biologische Aktivität durch mehrere Signalkaskaden hervorgerufen werden. Abbildung 3 gibt einen Überblick der durch VEGF-induzierbaren Signaltransduktionswege und ihrer zellulären Effekte.

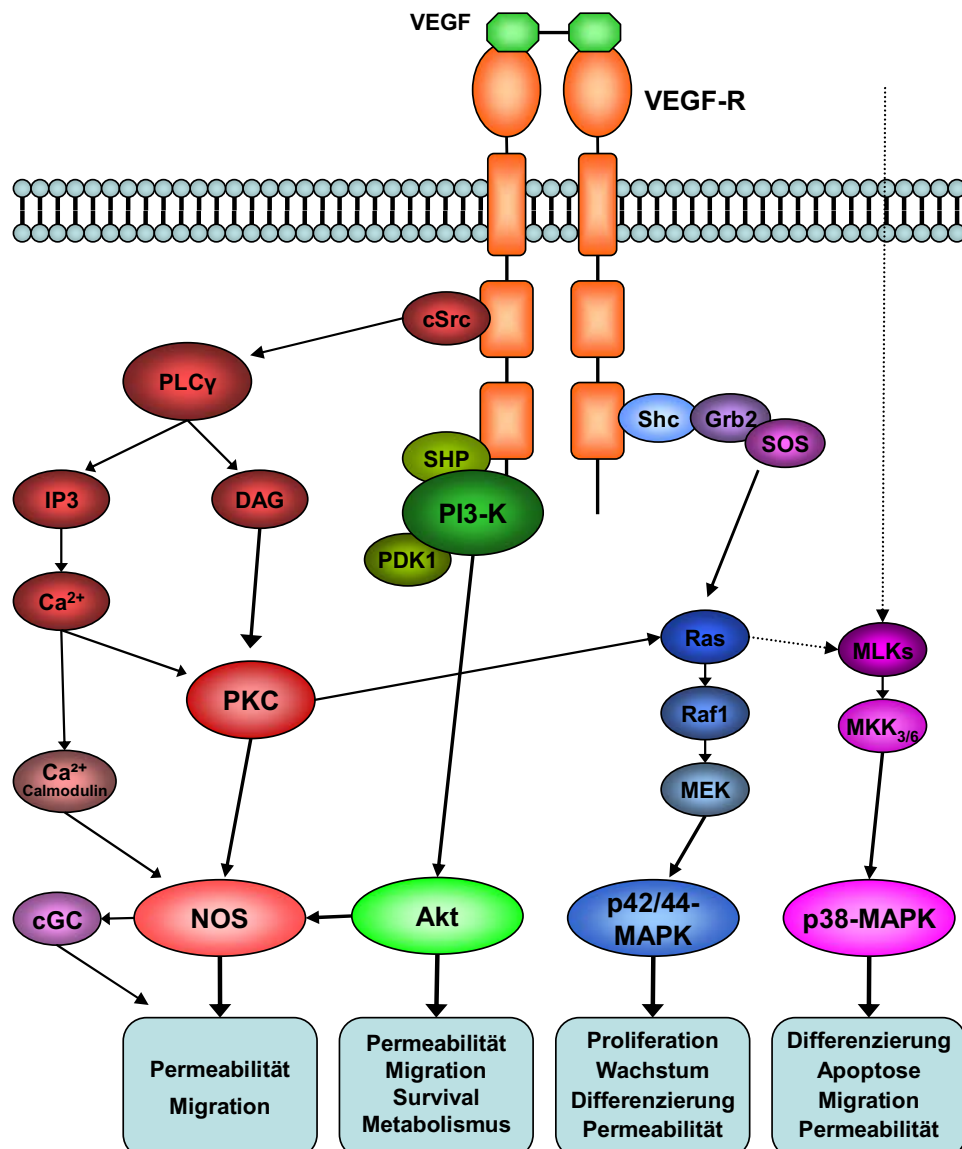


Abbildung 3: VEGF-induzierbare Signaltransduktionswege.

Der p42/44-MAPK/ERK_{1/2}-Signaltransduktionsweg

Durch die Autophosphorylierung des VEGF-Rezeptors erfolgt die Rekrutierung von Grb-2 an den Membranrezeptor. Dies geschieht entweder über direkte Bindung der SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste⁵⁵ oder über Bindung an das Adaptermolekül Shc⁵⁶. Durch die Phosphorylierung von Grb-2 kommt es zur Bildung des Grb2/SOS Protein-Komplexes, der wiederum Ras aktivieren kann. Dies stimuliert dann die Raf1/MAPK-K (MEK)/MAPK (ERK)-Signalkaskade. Aktive MAPK gelangen letztlich in den Zellkern, wo sie durch Phosphorylierung eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktivieren und die Genexpression regulieren können^{57,58}.

Neben dieser klassischen Ras-abhängigen Aktivierung von Raf kann auch die PKC den Signalweg stimulieren^{59,60}.

Aktivierte p42/44 MAPK haben Einfluss auf Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Permeabilität^{61,62,63,64,65}.

Der p38 MAPK-Signaltransduktionsweg

Die p38 MAPK sind eng mit den p42/44 MAPK/ERK_{1/2} verwandt. Es ist anzunehmen, dass cross-talks zwischen den Transduktionswegen der MAPK existieren. Auch die Substratspezifität der MAPK ist überlappend.

Zur Familie der p38 MAPK gehören vier verwandte Serin/Threonin-Kinasen⁶⁶. Alle vier Isoformen, p38 α - δ , werden durch die MKK_{3/6} (MAPK-Kinase) aktiviert. Die Phosphorylierung erfolgt dabei mit dualer Spezifität an Threonin und Tyrosin innerhalb eines charakteristischen, drei Aminosäuren umfassenden Motivs (Thr-Gly-Tyr). Die Aktivierung der MKK_{3/6} wiederum erfolgt durch verschiedene MKK-Kinasen wie die MLKs (Mixed lineage kinase). Neben der Stimulation durch aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), wie den VEGF-Rezeptoren, können die MLKs auch durch TNF, inflammatorische Zytokine, oxidativem Stress und UV-Strahlung aktiviert werden⁶⁷.

Über den p38 MAPK-Signaltransduktionsweg werden Differenzierung⁶⁸, Apoptose⁶⁹, Migration⁷⁰ und Permeabilität⁷¹ reguliert.

Der PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg

Nach Downward et al.⁷² erfolgt die Aktivierung des PI3-K/Akt Signalweges in mehreren Schritten. Zunächst werden Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-K) durch aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, hier den aktivierten VEGF-Rezeptoren, zur Membran rekrutiert und somit aktiviert. Die Bindung erfolgt dabei über die Src-Homologie 2-Domäne (SH2-Domäne). Aktivierte PI3-K katalysieren die Phosphorylierung von 3'-OH Gruppen am Inositolring der Inositolphospholipide. Die dadurch entstehenden Produkte sind Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI₍₃₎P), Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PI_(3,4)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI_(3,4,5)P₃). Diese können nun Proteine mit so genannten „Pleckstrin Homologie (PH)-Domänen“, darunter auch Akt, zur Membran locken und dort binden. Das so angedockte Akt kann dann über ein weiteres PH-Domänen aufweisendes Signalmolekül, der PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), phosphoryliert und damit aktiviert werden. Aktiviertes Akt kann nun als Proteinkinase verschiedene weitere Proteine der zellulären Signaltransduktion phosphorylieren, die dadurch aktiviert oder deaktiviert werden (Abbildung 4).

Aktiviertes Akt ist ein Überlebensfaktor der Zelle^{73,74}. Daneben kann es durch Aktivierung der Nitroxid-Synthase (NOS) Permeabilität und Migration regulieren⁷⁵. Zusätzlich beeinflusst Akt durch Aktivierung oder Hemmung bestimmter Schlüsselenzyme, die an metabolischen Reaktionswegen beteiligt sind, den Energiezustand der Zelle⁷⁶.

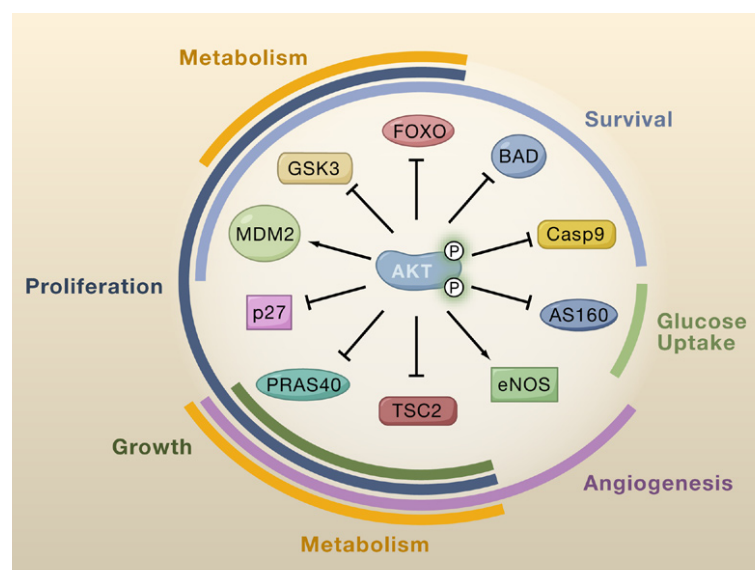


Abbildung 4: Schematische Darstellung verschiedener Substrate von Akt und ihrer zellulären Funktion (Quelle: Manning und Cantley, 2007⁷⁶)

Der PLC/Ca²⁺/PKC-Signaltransduktionsweg

Wie die PI3-K besitzt auch die PLC eine SH2-Domäne und kann darüber an aktivierte VEGF-Rezeptoren gebunden und dadurch stimuliert werden. Die PLC spaltet Phospholipide zwischen Glycerin und der Phosphatgruppe. Dabei werden aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat die für die zelluläre Signaltransduktion wichtigen „second messenger“ Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) gebildet. IP3 kann durch Bindung an spezifische Rezeptoren die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum, der als intrazellulärer Calcium-Speicher dient, bewirken. Ca²⁺ kann dann den Ca²⁺/Calmodulin-Komplex bilden, welcher die NOS stimuliert. Zusätzlich aktiviert die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration die PKC, welche dann die NOS phosphorylieren und damit ebenfalls aktivieren kann. Die Aktivierung der PKC ist damit Teil der VEGF-abhängigen Regulierung von Proliferation und Permeabilität⁷⁷. Durch die Aktivierung der NOS kommt es zur vermehrten Bildung von NO, welches die Angiogenese stimulieren und die vaskuläre Permeabilität erhöhen kann^{78,79}.

1.5 Biologische Aktivität von VEGF

1.5.1 Mitogenese, Angiogenese, Wirkung als Überlebensfaktor

Eine gut dokumentierte *in vitro*-Eigenschaft von VEGF ist die Fähigkeit zur Anregung des Wachstums von arteriellen, venösen und lymphatischen Endothelzellen. Darüber hinaus fördert VEGF die Angiogenese in dreidimensionalen *in vitro*-Modellen, indem das Einwandern von konfluenten mikrovaskulären Endothelzellen in das Kollagen-Gel induziert wird, wobei die Endothelzellen kapillarähnliche Strukturen formen^{80,81}. Auch bei einer Reihe von *in vivo*-Modellen führte VEGF zu einer angiogenen Antwort^{82,83}. Die Applikation von VEGF induziert unter bestimmten Voraussetzungen auch die Lymphangiogenese bei Mäusen⁸⁴. Die mitogene und proliferative Wirkung von VEGF wird dabei über den MAPK/ERK-Signalweg vermittelt.

Ferner ist VEGF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein Überlebensfaktor für Endothelzellen^{85,86}. So beugt VEGF der Apoptose vor, die durch Hungermedium oder

durch simulierte Mikrogravitation eingeleitet wird⁸⁷. Diese Aktivität wird über den PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg vermittelt⁷⁴. Akt bewirkt durch Phosphorylierung eine Inaktivierung von pro-apoptotisch wirksamen Proteinen mit BH3-Domäne, wie zum Beispiel BAD⁷⁶. Daneben inhibiert Akt die Transkription von pro-apoptotischen Proteinen durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie FOXO und p53 und fördert gleichzeitig die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2, A1⁸⁸, XIAP⁸⁹ und Survivin⁹⁰ in Endothelzellen (Abbildung 4). *In vivo* scheint die Wirkung von VEGF als Überlebensfaktor vom Status der Entwicklung abhängig zu sein. So führt die Inhibition von VEGF zu apoptotischen Veränderungen im Gefäßsystem der neonatalen, nicht aber der adulten Maus⁹¹.

Neben den Endothelzellen vermittelt VEGF seine Wirkung auch an verschiedenen nicht-Endothelzellen und Epithelzellen, so zum Beispiel den Retina Pigmentepithelzellen⁹² oder den Pankreasgangzellen⁹³. Campernolle et al. zeigten, dass VEGF die Produktion von Surfactant durch die Pneumozyten Typ II stimulieren kann und so protektiv im Rahmen des akuten Lungenversagens (ARDS) wirkt⁹⁴. VEGF wird auch eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen. So konnte neben der mitogenen Wirkung an Schwann-Zellen, was zur axonalen Aussprossung führt⁹⁵, auch ein direkter neuronaler Einfluss nachgewiesen werden. Hierbei schützt VEGF die Motoneurone vor einer Degeneration, wie sie zum Beispiel bei der amyotrophen lateralen Sklerose (ALS) auftritt⁹⁶.

1.5.2 Effekte auf Knochenmarkszellen

An Monozyten und Makrophagen, welche Flt-1, aber nicht Flk-1 auf der Zellmembran exprimieren, übt VEGF eine Migration der Zellen aus⁹⁷ und ist in der Lage die Chemotaxis zu fördern⁹⁸. Selvaraj et al. konnten in den Monozyten dann eine Aktivierung des PI3-K/Akt-Kinase und ERK-1/-2 Signalweges durch VEGF feststellen, was letztlich zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine führt⁹⁹.

Darüber hinaus hat VEGF einen hämatopoetischen Effekt. Dieser ist an der Koloniebildung reifer Subtypen der Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen erkennbar¹⁰⁰. Ferner erhöht VEGF die Produktion von B-Zellen und die Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen¹⁰¹.

1.5.3 Erhöhung der vaskulären Permeabilität

VEGF ist in der Lage, die vaskuläre Permeabilität zu erhöhen. Dadurch kommt es zum vermehrten Austreten von plasmaproteinreicher Flüssigkeit in den extravasalen Raum. Die Folge ist eine Ödembildung. So erklärt sich beispielsweise das ischämisch induzierte vasogene Hirnödem¹⁰², das hypoxische Lungenödem¹⁰³ oder auch die Ödembildung in entzündlichem und peritumorösem Gewebe.

Die VEGF-induzierte Erhöhung der vaskulären Permeabilität erfolgt durch Fenestrierung des Endothels sowie durch Konformationsänderungen im Bereich der interzellulären Verbindungen, was eine Erhöhung des parazellulären Transportes zur Folge hat¹⁰⁴. Im Rahmen der Transzytose und der Fenestrierung des sonst unfenestrierten Endothels kommt es zur Bildung von so genannten vesicular-vacuolaren Organellen (VVO)^{83,105}. Wie diese Membranstrukturen im Einzelnen aufgebaut sind, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen an mutierten Mäusen zeigten jedoch eine Beteiligung der Src-Tyrosin-Kinasen¹⁰⁶. Die Zugabe von VEGF induziert an Endothelzellen die Expression von Plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP), welches an der endothelialen Fenestrierung beteiligt ist. Strickland et al. zeigten, dass die Regulation von PLVAP durch den PI3-K/Akt- sowie den SAPK/p38-Signalweg vermittelt wird¹⁰⁷.

Die VEGF-induzierte Erhöhung der parazellulären Transportkapazität erfolgt durch Konformationsänderungen im Bereich der interzellulären Verbindungen. Diese Verbindungen werden durch einen spezialisierten Komplex gebildet, bestehend aus den Gap Junctions, Desmosomen, Adherence Junctions (AJ) und den Zonula Occludens, welche die Tight-junctions (TJ) enthalten. Die TJ sind entscheidend für die Ausbildung der Barriere-Funktion des Zell-Monolayers. Sie regulieren dabei die parazelluläre Passage von Ionen, Proteinen und anderen Substanzen. In der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie stellen sich die TJ als Netzwerk linearer Fibrillen dar, welche die Zellen umgeben und durch kurze transversale Fibrillen unterteilt sind¹⁰⁸. TJs bilden keine kontinuierliche Begrenzung rund um die Zelle. Die Anzahl der TJs korreliert mit der Barriere-Funktion der Zellschicht. So hat beispielsweise mikrovaskuläres Gehirnendothel eine hohe Dichte an TJs, wohingegen in postkapillären Venolen TJs praktisch gar nicht vorkommen¹⁰⁹. Inzwischen konnte eine Vielzahl von Proteinen, die mit den TJs assoziiert sind, identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem die zytoplasmatischen Zonula Occludens Proteine (ZO-1, ZO-2), JAM, das 7H6-Antigen

sowie die transmembranösen Proteine Occludin und Claudin. ZO-1 ist Teil des zyttoplasmatischen Plaques der TJ. Es interagiert mit ZO-2 und bindet das COOH-terminale zyttoplasmatische Ende von Occludin. Die beiden extrazellulären Schleifen von Occludin stellen den Zell-Zell-Kontakt her¹¹⁰. Daneben steht ZO-1 mit F-Aktin, einem wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts, sowie mit Proteinen der AJs in Verbindung^{111,112}.

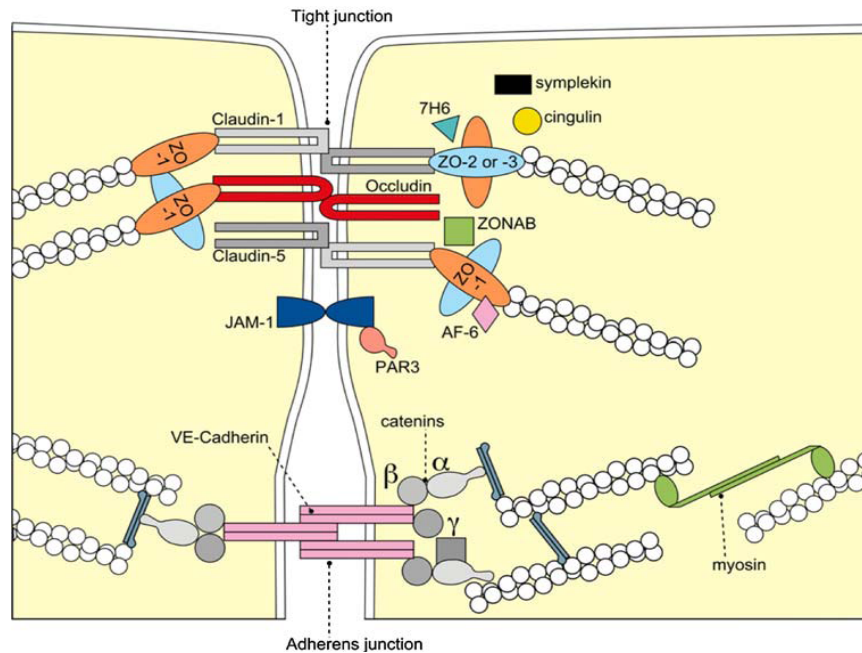


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tight- und Adhärenz Junctions im Bereich der apikal-lateralen Membran zwischen Endothel- oder Epithelzellen.
(Quelle: Forster C, 2008¹¹³)

Im Rahmen der VEGF-induzierten Hyperpermeabilität konnte eine Phosphorylierung verschiedener Proteine der TJs und AJs wie Cadherin^{114,115}, Catenin¹¹⁶, Occludin¹¹⁷, ZO-1 und ZO-2¹¹⁸ nachgewiesen werden. Diese Phosphorylierung führt dabei zur veränderten Lokalisation der Proteine und damit zur Erhöhung der Permeabilität¹¹⁹. Katalysiert wird die Phosphorylierung durch die PKC¹²⁰, wobei jedoch auch eine Beteiligung der Src-Tyrosin-Kinasen sowie der Proline-rich-Tyrosin-Kinase 2 (PYK2) nachgewiesen werden konnte^{121,122}.

TJs finden sich jedoch nicht nur an Endothelzellen, die eine spezialisierte Form der Epithelzellen darstellen. Auch viele andere Epithelien stellen eine Diffusionsbarriere für verschiedene Ionen, Proteine und Makromoleküle dar und sind daher mit TJs ausgestattet^{113,123}. Da die TJs auch die Diffusion von Ionen beeinflussen, lässt sich ihre Ausbildung durch die Messung des transepithelialen (oder transendothelialen) elektrischen Widerstandes bestimmen.

1.6 VEGF-Rezeptoren

Die biologische Wirkung von VEGF wird durch Bindung an die spezifischen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) VEGF-Rezeptor-1 (fms-like tyrosine kinase, Flt-1), VEGF-Rezeptor-2 (fetal liver kinase-1, Flk-1) und VEGF-Rezeptor-3 (Flt-4) vermittelt. Die VEGF-Rezeptoren gehören der Familie der Platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptoren an. Sie bestehen aus sieben extrazellulären Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, einer transmembranösen Domäne, einer regulierenden juxtamembranösen Domäne, einer intrazellulären Domäne, die die Tyrosin-Kinase Domäne enthält, sowie einer Sequenz, die verschiedene Tyrosinreste trägt^{124,125,126,127}.

Die Rezeptoren werden hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert. Inzwischen wurden sie aber auch auf verschiedenen Nicht-Endothelzellen nachgewiesen. Dazu gehören die hämatopoetischen Zellen¹²⁸, Makrophagen¹²⁹, glatte Muskelzellen¹³⁰ und renale Mesangialzellen¹³¹. Bei einer Vielzahl von Malignomzellen konnten ebenfalls die Rezeptoren in unterschiedlichem Verteilungsmuster nachgewiesen werden^{132,133}. Daneben finden sich die VEGF-Rezeptoren auch auf einer Reihe von Epithelzellen und vermitteln hier eine spezifische Wirkung. So konnte an Retinalzellen^{134,135}, Endometriumzellen¹³⁶ und Prostataepithelzellen¹³⁷ eine Proliferation nach Zugabe von VEGF gemessen werden. In Alveolarzellen kommt es zur vermehrten Bildung von Surfactant⁹⁴ und die Wundheilung scheint durch anti-apoptotische und proliferative Reize beschleunigt zu sein¹³⁸. Bei renalen Tubulusepithelzellen bewirkt VEGF nach Bindung an seine Rezeptoren die Ausbildung von Tubuli¹³⁹.

Verschiedene Analysen der extrazellulären Domänen von Flt-1 und Flk-1 zeigten, dass die zweite und dritte Ig-ähnliche Domäne die Ligandenbindungs-Domänen darstellen während die erste und vierte Domäne die Ligandenbindung sowie die Bildung von Rezeptor-Dimeren regulieren^{140,141,142}.

Nach der Bindung von VEGF an seine Rezeptoren kommt es durch Konformationsänderung im Bereich der vierten extrazellulären Domäne zur Bildung von Rezeptor-Dimeren¹⁴³. Neben der Bildung von Homodimeren ist dabei auch eine Bildung von Heterodimeren der VEGF-Rezeptoren möglich¹⁴⁴. Die Dimerisation führt dann zu strukturellen Änderungen im Bereich der intrazellulären Tyrosin-Kinase Domäne, wodurch letztlich die Tyrosin-Kinase aktiviert wird. Die genauen molekularen Mechanismen, die diese Veränderungen bewirken, sind bisher nicht vollständig geklärt.

An anderen PDGF-Rezeptoren konnte aber eine Beteiligung der trans- und juxtamembranen Domänen nachgewiesen werden^{145,146}. Durch die Aktivierung der Tyrosin-Kinase kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten im intrazellulären Bereich der Rezeptoren. Dadurch entstehen unter anderem Bindungsstellen für Proteine, die eine sogenannte Src-homology 2-(SH2)-Domäne aufweisen, wie zum Beispiel die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-K).

Die verschiedenen VEGF-Subtypen zeigen eine Spezifität hinsichtlich der Bindung an die VEGF-Rezeptoren. So bindet VEGF (VEGF-A) an Flt-1 und Flk-1 sowie an Heterodimere der Rezeptoren (Flt-1/Flk-1)⁵⁶. VEGF-C und -D interagieren mit Flk-1 und Flt-4. VEGF-B und PlGF binden nur an Flt-1^{147,148,149}, VEGF-E lediglich an Flk-1^{150,151} (Abbildung 6).

Neben der Bindung ihres spezifischen Liganden VEGF interagieren die VEGF-Rezeptoren noch mit einer Reihe anderer zellulärer Proteine wie Neuropilin-1 und-2, Heparin, Integrinen und Cadherinen. Durch diese Interaktionen scheinen die Rezeptoren in ihrer Aktivität reguliert zu werden.

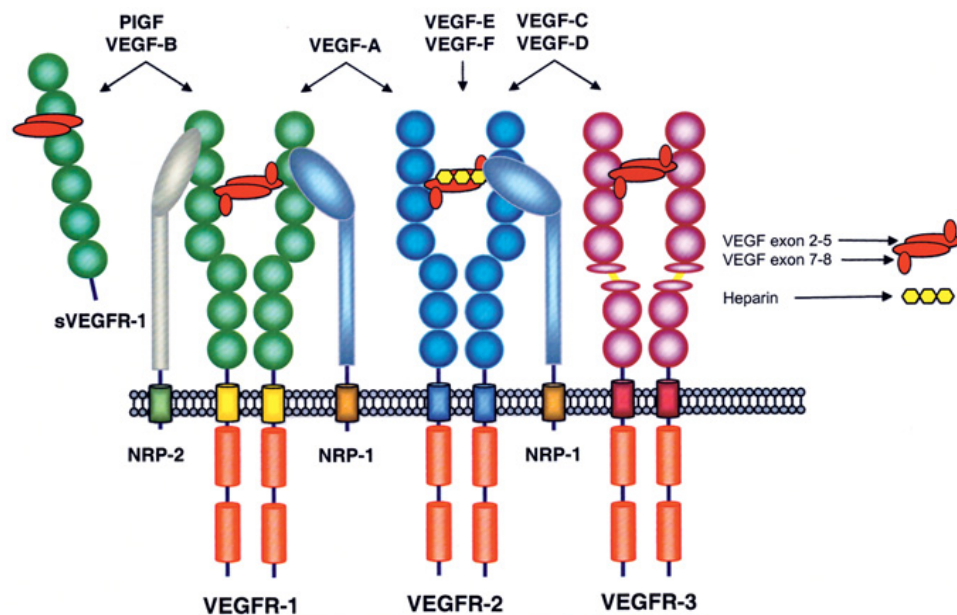


Abbildung 6: Schematische der VEGF-Subtypen und ihrer Rezeptoren.
(Quelle: Cebe-Suarez et al. 2006⁵⁷)

Die Expression der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 wird durch Hypoxie gesteigert, jedoch in geringerem Maße als die des Liganden, VEGF selbst. Da Gerber et al. eine Transkriptionssteigerung von lediglich Flt-1 infolge Hypoxie via HIF-1 zeigen konnten¹⁵², wird für VEGFR-2 ein posttranskriptioneller Mechanismus angenommen¹⁵³.

Außerdem kann der Expressionsanstieg indirekt verstärkt werden, da VEGF auch selbst die Expression seiner Rezeptoren fördert¹⁵⁴. Flt-1 wiederum wirkt als Negativ-Regulator bezüglich der Flk-1-Expression¹⁵⁵.

1.6.1 VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1)

Die genaue biologische Wirkweise von Flt-1 ist bisher nicht vollständig verstanden und wird kontrovers diskutiert. Flt-1 ist ein 180-kDa Glykoprotein. Flt-1 hat im Vergleich zu Flk-1 eine deutlich geringere Kinase-Aktivität, zeigt jedoch eine 10mal höhere Bindungsaffinität zu VEGF¹⁵⁶. Für eine Reihe von Signalmolekülen konnte bisher eine Aktivierung durch Flt-1 nachgewiesen werden^{157,158}. So stellen die phosphorylierten Tyrosinreste Tyr1213 und Tyr1333 Bindungsstellen für Adaptermoleküle wie Nck¹⁵⁹, Crk, Grb-2¹⁶⁰, Sck¹⁶¹, die regulierende Untereinheit p85 der PI3-Kinase¹⁶² sowie der Phosphatase SHP-2¹⁶³ dar. Bei der PLC γ konnte eine Bindung an die Tyrosinreste Tyr794 und Tyr1169 gezeigt werden¹⁶⁴. Alle Adaptermoleküle zeichnen sich dabei durch das Vorliegen der Scr-homology-2 (SH2)-Domäne aus.

Der Rezeptor ist notwendig für die embryonalen Angiogenese. So führt eine homozygote Deletion von Flt-1 bereits im Embryonalstadium (Tag E8,5) zu einem letalen Phänotyp der Maus infolge schwerer Fehlbildungen des Gefäßsystems¹⁶⁵. Zwar kommt es hierbei zur Entwicklung von Endothelzellen, doch fehlt die Entwicklung von organisierten Kapillaren. Unklar ist, warum die Zugabe einer Tyrosin-Kinase-inaktiven Form von Flt-1 die Flt-1^{-/-} Mäuse schützt¹⁵⁵. Daneben scheint Flt-1 eine Rolle im Rahmen der pathologischen Angiogenese und der Wundheilung zu spielen¹⁶⁶. Dieser Effekt soll unter anderem durch Potenzierung der Aktivität von Flk-1 geschehen¹⁶⁷. Der genaue Mechanismus dieses intermolekularen cross-talk ist dabei unklar. Unbestritten ist die Rolle von Flt-1 im Rahmen der Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen aus den Knochenmarksvorläuferzellen^{97,168} sowie die Migration und Chemotaxis von Monozyten¹⁶⁹. Nach Bindung von VEGF oder PlGF aktiviert Flt-1 hier den PI3-K/Akt- sowie den p42/44 MAPK/ERK1/2-Signalweg. Ebenfalls über Aktivierung der MAPK vermittelt Flt-1 in Pankreaskarzinomzellen eine Migration und Invasion der Tumorzellen¹⁷⁰. Andere Untersuchungen belegen hingegen, dass Flt-1 nicht in der Lage ist, die MAPK zu aktivieren^{56,171}.

Bezüglich der Flt-1 Aktivierung bei der VEGF-induzierten Hyperpermeabilität gibt es unterschiedliche Aussagen. Glass et al. postulierten nach Versuchen mit spezifischen

Inhibitoren von Flt-1 und Flk-1, dass die Hyperpermeabilität überwiegend durch Flt-1 vermittelt wird¹⁷². Bestätigt wurden ihre Ergebnisse durch Stacker et al., die in ihrem *in vivo* Modell einen Mutanten von VEGF, welcher nicht mehr an Flk-1 bindet, verwendeten und dabei ebenfalls eine Zunahme der Permeabilität maßen¹⁷³. Odorisio et al. wiesen schließlich in *in vivo*-Modellen von transgenen Mäusen, welche PlGF überexprimierten, eine Erhöhung der Vaskularisation und vaskulären Permeabilität nach¹⁷⁴. Andere Autoren sind hingegen der Meinung, dass eine alleinige Aktivierung von Flk-1 ausreichend sei, die Mehrzahl der VEGF-Effekte (so auch die Hyperpermeabilität) zu erzeugen^{118,144,175}. Weiter erschwert wird die Frage nach der Rezeptorabhängigkeit durch die Tatsache, dass die VEGF-Rezeptoren Heterodimere bilden können. Ferner wird die Möglichkeit eines intermolekularen cross-talk beschrieben¹⁶⁷.

Während die VEGF-induzierte Proliferation von Endothelzellen durch Flk-1 vermittelt wird, scheint Flt-1 an der Aufrechterhaltung und Überlebensfunktion des adulten Endothels beteiligt zu sein. So konnte hier eine hohe Expression der Flt-1 mRNA nachgewiesen werden¹⁷⁶.

Bei einigen Tumorzellen scheint Flt-1 jedoch eine starke proliferative Wirkung zu zeigen. So konnte in Zellen des Bronchialkarzinoms, die Flt-1 exprimieren, ein schnelleres Wachstum nachgewiesen werden im Vergleich zu Zellen, die Flt-1 nicht aufweisen¹⁷⁷. In diesem Zusammenhang konnte auch eine Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) nachgewiesen werden¹⁶⁶.

Neben dem membrangebundenen Rezeptor gibt es auch eine lösliche Form des Flt-1-Rezeptors (sFlt). sFlt entsteht durch alternatives splicing. Ihm fehlt die siebte Ig-ähnliche Domäne, die Transmembran-Sequenz und die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne¹⁷⁸. sFlt konkurriert mit den membrangebundenen Rezeptoren um die Bindung mit VEGF und kann so eine kompetitive Hemmung bewirken. Ihm werden dadurch regulierende Eigenschaften zugeschrieben^{179,180}. Klinisch wird sFlt in Zusammenhang mit der Entstehung der Präeklampsie gebracht¹⁸¹. Das in der Placenta überexprimierte sFlt bewirkt unter anderem in der Niere eine Hemmung von VEGF. Hierdurch kommt es zur Schwellung der Endothelzellen und damit zum Verschluss der Kapillaren. Dies führt zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate und damit zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion, die Folgen sind Wassereinlagerungen und Bluthochdruck¹⁸².

1.6.2 VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1)

Der VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1) ist ein 200-kDa Glykoprotein. Flk-1 hält eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Angiogenese und Hämatopoese inne. So entwickeln sich bei Flk-1-defizienten Mäusemryos keine Angioblasten, hämatopoetische Zellen oder differenzierte Endothelzellen und die Bildung von Blutgefäßen bleibt aus. Die Tiere versterben noch *in utero* um den 8. Embryonaltag¹⁸³. Flk-1 wird überwiegend in proliferierenden Gefäßsystemen exprimiert, wohingegen seine Expression in adulten und ausgereiften Geweben unter physiologischen Bedingungen herabreguliert wird. Dies unterstreicht seine Bedeutung in der Vaskulogenese und Angiogenese¹⁸⁴.

Wie Flt-1 besitzt Flk-1 eine Reihe von intrazellulären Tyrosinresten, welche nach Bindung von VEGF an den Rezeptor und anschließender Dimerisierung durch die Tyrosin-Kinase des Rezeptors phosphoryliert werden¹⁸⁵. An diese phosphorylierten Tyrosinreste können dann Adaptermoleküle binden und so verschiedene Signalwege aktivieren. Die Adaptermoleküle zeigen dabei meist das Vorliegen einer SH2-Domäne und entsprechen damit den Adaptermolekülen, die an aktivierten Flt-1 binden.

Flk-1 vermittelt die VEGF-induzierte Endothelzellproliferation über eine Aktivierung verschiedener Signalwege. Ähnlich wie bei anderen Mitgliedern der RTK-Familie kann so der Ras-Signalweg aktiviert werden¹⁸⁶.

Auch die PI-3/Akt-Signalkaskade kann durch Bindung von VEGF an Flk-1 (aber auch an Flt-1) stimuliert werden, doch wird ihre Beteiligung an der Proliferation von Endothelzellen kontrovers diskutiert^{187,188}.

Neben der Zellproliferation ist die Migrationsfähigkeit der Zellen eine essentielle Voraussetzung für die Vaskulo- und Angiogenese. Wird die Migration in Monozyten durch Flt-1 vermittelt, scheint sie in Endothelzellen hingegen durch Flk-1 vermittelt zu werden. Dabei kommt es durch Aktivierung der PKC zur Phosphorylierung der focal adhesion kinase (FAK), die am Ab- und Umbau der fokalen Adhäsionen sowie des Aktin-Zytoskelettes beteiligt sind^{189,190}. Zusätzlich kann die VEGF-induzierte Endothelzellmigration auch durch Aktivierung der p38-Signalkaskade beeinflusst werden¹⁹¹. Diese führt zur Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern sowie zur Aktivierung der MAPKAPK-2 und -3 (MAPK-activated-protein-kinase) mit anschließender Phosphorylierung des heat-shock-protein-27 (HSP27)^{192,193}. Dies führt letztlich zur Umorganisation des Aktinzytoskelettes und Bildung von Mikrofilamenten¹⁹⁴.

1.6.3 VEGF-Rezeptor-3 (Flt-4)

Flt-4 findet sich in der Embryonalentwicklung zunächst in allen Endothelzellen. Ab dem Embryonaltag E8,5 lässt es sich lediglich in den sich entwickelnden Venen und Lymphgefäßen und nicht mehr im arteriellen Gefäßsystem nachweisen. Im adulten Stadium ist Flt-4 nur noch in Lymphgefäßendothelien zu finden. Die Deletion von Flt-4 führt in Mausembryos zur Fehlbildung der großen Gefäße mit einem fehlerhaften Lumen¹⁹⁵. Dies führt zur Erweiterung der Herzkammern und letztlich zum Embryontod um E9,5¹⁹⁶. Einige Untersuchungen konnten Flt-4 auch in Gefäßendothelien in der Nähe eines Tumors oder in den Tumorzellen selbst nachweisen^{197,198}. Flt-4 vermittelt in Lymphendothelien die Zellmigration und die überlebensfördernde Wirkung durch Aktivierung der PKC-abhängigen MAPK-Signalkaskade sowie der PI3-K/Akt-Signalkaskade^{199,200}.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In vorausgegangenen Studien konnte am *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke, bestehend aus mikrovaskulären Gehirnendothelzellen vom Schwein (BMEC), die Beteiligung von VEGF an der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollte nun der Mechanismus der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität näher untersucht werden. Dabei sollte speziell geklärt werden, welcher der beiden VEGF-Rezeptoren (Flt-1 und Flk-1) an der Induktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität via VEGF beteiligt ist und welche Signaltransduktionswege dabei aktiviert werden.

Zur Klärung dieser Frage sollten Permeabilitätsänderungen des BMEC-Zellmonolayers unter hypoxischen Bedingungen und nach Zugabe verschiedener Subtypen von VEGF sowie unter Verwendung spezifischer Antisense-Oligonukleotide gegen Flt-1 und Flk-1 bestimmt werden.

Um eine Rezeptor-Heterodimerbildung oder einen intermolekularen cross-talk auszuschließen, sollten die Permeabilitätsversuche auch an einer Zellart durchgeführt werden, die nur einen der VEGF-Rezeptoren exprimieren. Da Endothelzellen stets beide VEGF-Rezeptoren exprimieren, sollten dazu Epithelzellen, von denen bekannt ist, dass sie teilweise nur einen der VEGF Rezeptoren exprimieren und die zusätzlich ähnlich dichte Monolayer wie Endothelzellen mit hohen Widerstandswerten bilden, verwendet werden.

Anschließend sollte dann die VEGF- und Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität dieser Flt-1 und/oder Flk-1 exprimierenden Epithelzellen unter Verwendung neutralisierender Antikörper gegen VEGF, verschiedener Subtypen von VEGF sowie mit Antisense-Oligonukleotiden gegen Flt-1 und Flk-1 untersucht werden.

Die Beteiligung der verschiedenen Signaltransduktionswege an der durch Flt-1 vermittelten VEGF- und Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität sollte durch die Zugabe von spezifischen Inhibitoren und entsprechender Western Blot Analysen untersucht werden. Letztlich sollte noch geprüft werden, ob auch die proliferativen Effekte von VEGF durch Flt-1 in Abwesenheit von Flk-1 induzierbar sind.

2. Methoden

2.1 Zellkultur

In den Untersuchungen dieser Dissertationsarbeit wurden Primärzellen des Choroid Plexus Epithels (CPE), mikrovaskuläre Gehirndothelzellen (BMEC) vom Schwein sowie die Zelllinien Madin-Darby canine kidney epithelial cells (MDCK) und Epithelzellen aus Submandibulardrüsengewebe der Maus (CSG) verwendet.

Sämtliche Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.1.1 Kultivierung der Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 37°C in feuchter Atmosphäre unter 21 Vol.-% Sauerstoff und 5 Vol.-% Kohlendioxid kultiviert. Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten und ein rasches Absterben der Zellen zu verhindern, wurde – in Abhängigkeit von der Zelldichte auf der Zellkulturschale – alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt, oder die Zellen wurden trypsiniert, anschließend im Verhältnis 1:3 bis 1:8 mit Medium verdünnt und passagiert. Für einen konfluenten Monolayer benötigten die Zellen je nach Zelltyp zwischen drei und zehn Tage.

2.1.2 Passagieren der Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden nach Abziehen des alten Mediums einmal mit warmen PBS gewaschen. Danach wurde der Zellmonolayer mit 5 ml Trypsin/EDTA überschichtet und für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde abgezogen und die Zellen erneut für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ablösung der Zellen konnte unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden. Durch Zugabe von Kulturmedium mit 10% FCS wurde die Reaktion gestoppt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 200 g wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und auf neue Petrischalen ausgesät.

2.1.3 Einfrieren, Lagerung und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsinisiert und anschließend zentrifugiert (200 g, 4min, 25°C). Das Pellet wurde in reinem FCS aufgenommen. Zur Zellsuspension wurde Kulturmedium mit 20% DMSO im Verhältnis 1:1 langsam hinzugefügt. Aliquots von 2×10^6 Zellen/ml wurden vorsichtig in Cryoröhrchen transferiert und nach langsamem Abkühlen bei -80°C eingefroren. Zum längeren Aufbewahren wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Auftauen der Zellen wurde eine Zellportion auf 37°C erwärmt und mit 10 ml Kulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (200 g, 4min, 25°C), das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in 10 ml Medium wurden die Zellen auf eine Kulturschale ausgesät und im Brutschrank bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert.

2.1.4 Zellzahlbestimmung

Sollten die Zellen auf Transwell®-Filter oder Objektträger ausgesät werden, war eine Bestimmung der Anzahl lebender Zellen nötig. Dadurch konnte bei jedem Versuch von einer gleichen Zellzahl ausgegangen werden.

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu mussten die Zellen trypsinisiert und anschließend resuspendiert werden. 20µl der Resuspension wurden mit 20µl Trypanblaulösung (Trypanblau in PBS 1:4) versetzt. Trypanblau dringt in tote Zellen ein, auf Grund der intakten Membranintegrität aber nicht in lebende Zellen. Dadurch erscheinen tote Zellen unter dem Mikroskop dunkelblau und werden nicht mitgezählt.

Alle 16 kleinen Quadrate der Zählkammer wurden ausgezählt. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1mm² und ein Volumen von 0,1µl. Die Anzahl der lebenden Zellen pro ml erhält man durch Einsetzen in:

$$\text{Anzahl lebender Zellen / ml} = [\sum \text{lebender Zellen} \times 10^4] \times 2 / 16$$

Anschließend wurde ein errechnetes Volumen der Resuspension mit frischem Medium versetzt und die Zellen konnten in der gewünschten Zelldichte ausgesät werden.

2.1.5 Konstanz und Reproduzierbarkeit in der Zellkultur

Um das Risiko von Mutationen, die durch zu häufige Teilung der Zellen verursacht werden können, zu minimieren, wurden die Zelllinien von CSG und MDCK nur bis zur Passage 20 verwendet.

CPE und BMEC wurden nur als Primärkultur verwendet, da Veränderungen der Morphologie der Zellen durch mehrfaches Passagieren zu befürchten war.

Es wurde ebenfalls darauf geachtet, dass die Zellen vor Versuchsbeginn stets eine gleich hohe Konfluenz aufwiesen.

2.2 Verwendete Primärzellkulturen

2.2.1 Choroid Plexus Epithelzellen (CPE)

Isolierung und Kultivierung der CPE-Zellen

Die Zellisolierung der Choroid Plexus Epithelzellen erfolgte in Anlehnung an die von Crook et al. beschriebene Methode²⁰¹.

Etwa 15 Gehirne von wenigen Stunden zuvor geschlachteten Schweinen wurden für den Transport vom Schlachter zum Labor in 300 ml HBSS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} mit Gentamicin (50 $\mu\text{g/ml}$) auf Eis aufbewahrt. Die weitere Prozedur wurde im Labor unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Choroid Plexus konnten mit einer Pinzette aus den Ventrikeln der Hirne herausgezogen werden und in eine Petrischale mit HBSS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} überführt werden. Es wurden nur Plexus aus den Seitenventrikeln benutzt. Die zurückbleibenden Hirne wurden in 70% Isopropanol auf Eis überführt und konnten anschließend für die Isolierung der BMEC herangezogen werden.

Die isolierten Choroid Plexus wurden daraufhin dreimal durch Schwenken in HBSS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} gewaschen. Dadurch wurde versucht, möglichst viele Erythrozyten aus dem Gefäßgeflecht der Plexus sowie eventuell anheftende Verunreinigungen herauszulösen. Die Plexus wurden dann in ein verschließbares Glasgefäß überführt und das Feuchtgewicht bestimmt. Pro 100 mg Plexus wurden 1 ml 0,25% Trypsin/EDTA und 1ml HBSS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann 2 Stunden bei 4°C

unter Rühren inkubiert. In dieser Zeit konnten die Proteasen das Gewebe durchdringen ohne enzymatisch aktiv zu sein. Anschließend wurde der Ansatz für 20 Minuten bei 37°C unter Rühren inkubiert. Dabei sollten sich die Epithelzellen aus dem Gewebe lösen. Die unverdauten Reste der Choroid Plexus wurden mit einer Pinzette aus dem Ansatz entfernt.

Zur Überprüfung des Erfolges der Isolation wurden 50 µl des Ansatzes mit 50 µl Trypanblaulösung gemischt und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und beurteilt.

Um den enzymatischen Verdau der Zellen durch das Trypsin zu stoppen, wurden 15ml FCS hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (700 g, 4min) und das Pellet zweimal in HBSS (10 ml, 700 g, 4min) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in CPE-Medium resuspendiert und konnte dann ausgesät werden.

24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wurden diese zweimal mit warmen PBS gewaschen und so die Erythrozyten und andere nicht adhärenente Zellen entfernt. Um die Reinheit der Epithelzellen zu erhöhen und eine Kontamination mit Bindegewebs-, glatten Muskel- und Endothelzellen zu minimieren wurde dem Kulturmedium Cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C) in einer Konzentration von 20 µM zugesetzt²⁰². Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

In den Versuchen wurden nur Primärzellkulturen verwendet.

Laminin-Beschichtung der Zellkulturflächen

Für die Kultur von CPE-Zellen ist es notwendig, die Transwell®-Filter und 8-Kammer-Objektträger mit Laminin zu beschichten. Dazu wurde eine Lösung von Laminin in PBS mit der Konzentration 10 µg/ml hergestellt. Von dieser Lösung wurden 150 µl je Transwell®-Filter und 300 µl je Objektträgerkammer aufgetragen und für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Überstand abgezogen und die Kulturfläche einmal mit PBS gewaschen.

Sollten die CPE-Zellen auf Petrischalen ausgesät werden, wurden bereits beschichtete Petrischalen erworben.

2.2.2 Mikrovaskuläre Gehirndothelzellen vom Schwein (BMEC)

Isolierung und Kultivierung der BMEC

Die Zellisolierung erfolgte in Anlehnung an die von Mischeck beschriebene Methode²⁰³.

Etwa 15 Gehirne von wenigen Stunden zuvor geschlachteten Schweinen wurden für den Transport vom Schlachthof zum Labor in 300 ml HBSS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} mit Gentamicin (50 $\mu\text{g/ml}$) auf Eis aufbewahrt. Im Labor wurden dann die Choroid Plexus aus den lateralen Ventrikeln für die Isolierung der Choroid Plexus Epithelzellen herauspräpariert. Die Gehirne wurden dann für 10 Minuten in 4°C kaltes Isopropanol (70%) und anschließend in 37°C warmen Earle Salz Puffer + NaHCO_3 überführt.

Entfernen von Kleinhirn, Hirnstamm, Hirnhäuten und mechanische Zerkleinerung

Nach kurzem Abflammen der Hirne wurden Kleinhirn und Hirnstamm entfernt. Danach erfolgte die sorgfältige Abpräparation der Hirnhäute. Anschließend erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Hirne mit Skalpell auf einer sterilen Glasplatte.

Enzymatische Verdauung

Die zerkleinerten Gehirne wurden in ein 1 l Becherglas mit 200 ml 37°C warmen BMEC-Medium ohne FCS gegeben. Nach und nach wurde dann unter Rühren 5mg Dispase (gelöst in 45 ml BMEC-Medium ohne FCS) hinzugegeben.

Die Suspension wurde dann bis zum Eintritt der Homogenisierung etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Dextran-Gradient

Das Homogenisat wurde auf sechs Zentrifugenröhrchen verteilt und mit 150 ml 15%-Dextran + NaHCO_3 versetzt und gut geschüttelt. Die Suspension wurde dann bei 6800rpm für 10 Minuten bei 4°C (Sorvall-GS-3) zentrifugiert. Der vornehmlich aus Fett und Dextran bestehende Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in je 8 ml BMEC-Medium ohne FCS aufgenommen und anschließend vereint.

Filtration

Die Zellsuspension wurde durch ein Siebgewebe aus Polyester (250 μm Porengröße) filtriert.

Inkubation und weitere enzymatische Verdauung

Dem Filtrat wurden 70 mg Kollagenase/Dispase (gelöst in 3 ml BMEC-Medium ohne FCS) zugesetzt. Dann wurde für vier Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Zentrifugation und Beurteilung der Zelldichte

Die Zellsuspension wurde in zwei 50 ml-Falconröhrchen überführt und dann zentrifugiert (700 g, 25°C, 10min). Die Überstände sowie die Fettschicht wurden verworfen. Die Pellets wurden vereint und in 30 ml BMEC-Medium suspendiert. Wieder wurde zentrifugiert (700 g, 25°C, 10min), der Überstand verworfen und das Pellet in 30 ml BMEC-Medium resuspendiert.

250 µl der Suspension wurden in einer Petrischale mit 10 ml BMEC-Medium verdünnt und zum Abschätzen der Zelldichte mikroskopisch beurteilt (Erfahrungswert). Die Petrischale wurde dann in den Brutschrank überführt, um in den darauffolgenden Tagen das Zellwachstum zu verfolgen und eine eventuelle Kontamination der Primärzellen durch Bakterien zu erkennen.

Kollagen-Beschichtung der Zellkulturflächen

BMEC benötigen für ihr Wachstum als Untergrund eine Kollagen-Matrix. Es war also nötig, die Zellkulturflächen mit Kollagen zu beschichten.

Zum Beschichten der 96-Well-Mikrotiterplatten sowie der Transwell®-Filter wurde eine Lösung von Kollagen Typ 1 in 0,02 M Essigsäure (Verhältnis 1:50) hergestellt und davon 50 µl je Well aufgetragen. Die Platten wurden über Nacht offen stehen gelassen. Nach dem Eintrocknen wurden sie einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten nun ausgesät werden.

Kollagenbeschichtete Petrischalen und 8-Kammer-Objektträger wurden käuflich erworben.

Charakterisierung der BMEC

Eine ausführliche Charakterisierung der Zellen wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten der Forschungsgruppe durchgeführt. Die BMEC konnten dabei auf Grund ihrer Morphologie, der hohen Anzahl LDL-positiver Zellen, der positiven Von-Willebrand-Färbung der Zellen sowie dem geringen Nachweis von „ α -smooth-muscle“-Aktin eindeutig als Endothelzellen charakterisiert werden^{204,205}.

2.3 Verwendete Zelllinien: CSG und MDCK

Bei den CSG-Zellen (carcinoma submandibular gland cells) handelt es sich um die Zelllinie CSG 120/7, einer Epithelzelllinie aus explantierten Submandibulardrüsengewebe der Maus. Ultrastrukturanalysen zeigten, dass es sich bei CSG 120/7 um gut differenzierte Epithelzellen handelt, die typische junctionale Komplexe ausbilden²⁰⁶. Bamforth et al. wiesen dann immunhistochemisch unter anderem die „tight-junction“-Proteine ZO-1, ZO-2, E-Cadherin und Occludin nach²⁰⁷.

Die MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney cells) wurden erstmals 1958 von Madin und Darby isoliert. Sie sind eine immortalisierte Zelllinie des Nierentubulusepithels von adulten weiblichen Hunden und wurden seit ihrer Erstbeschreibung oft charakterisiert^{208,209}. Auch sie bilden typische junctionale Komplexe²¹⁰.

2.4 *In vitro*-Hypoxiemodell

In dieser Arbeit wurde unter Anderem das Verhalten der Zellen unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Dazu wurde ein spezielles Kammersystem (Abbildung 7) verwendet, durch das eine konstante Atmosphäre von 2 Vol.-% Sauerstoff, 5 Vol.-% Kohlendioxid und 93 Vol.-% Stickstoff bei 37°C und hoher Luftfeuchtigkeit erreicht werden konnte.

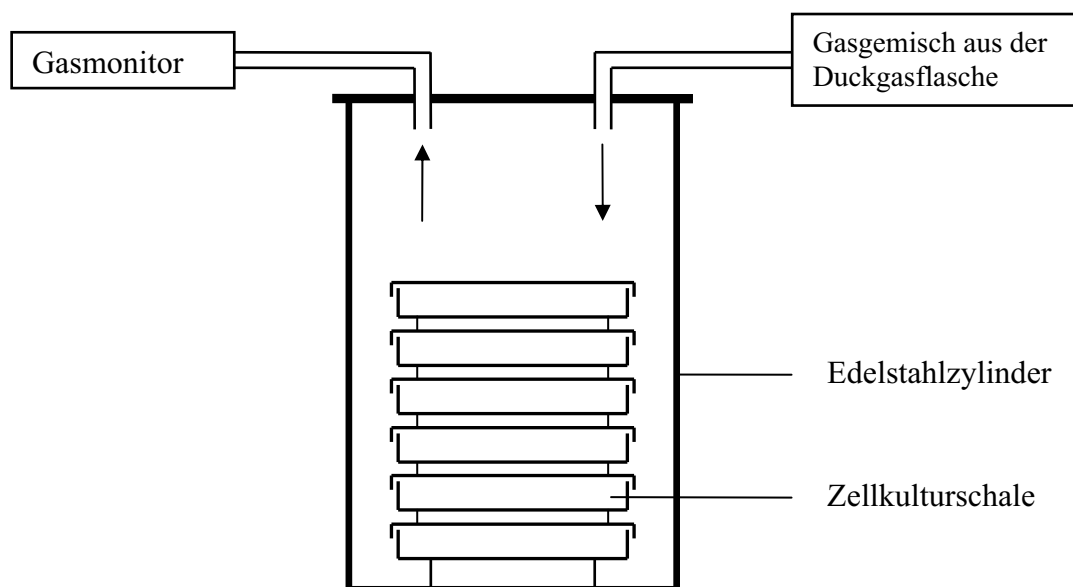


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Hypoxie-Kammersystems

Das Kammersystem bestand aus einem Edelstahlzylinder (Innenmaße: 180mm Durchmesser, 215mm Höhe, 5mm Wandstärke), der durch einen Plexiglasdeckel gasdicht verschlossen werden konnte. Um eine gute Wärmeisolierung zu erzielen, war der Edelstahlzylinder in Styropor eingebettet. Ein Thermostat regelte über Leistungstransistoren elektronisch die Innentemperatur auf 37°C. Ein Ventilator sorgte für eine ständige Umwälzung der Innenluft. Die hohe Luftfeuchtigkeit von 80 – 90 % wurde durch Benetzen des Kammerbodens mit Wasser erreicht. Mittels Messfühler wurden Temperatur und Luftfeuchtigkeit in der Kammer ständig kontrolliert und protokolliert. In den Plexiglasdeckel waren zwei Ventile eingelassen, durch die das Gasgemisch ein- und ausströmen konnte.

Für die hypoxische Atmosphäre innerhalb der Kammer sorgte eine Druckgasflasche, die ein Gasgemisch mit 2 Vol.-% Sauerstoff, 5 Vol.-% Kohlendioxid und 93 Vol.-% Stickstoff enthielt. Die herstellerbedingten Abweichungen lagen bei ± 2 %-rel. bezogen auf den Sollwert. Über ein Ventil geregelt strömte das Gas mit 7 l/min in die Kammer ein. Nach etwa 10 bis 15 Minuten war die Raumluft aus der Kammer verdrängt und es herrschten hypoxische Bedingungen. Die Gaszufuhr konnte dann auf etwa 3l/min gedrosselt werden. Der Gasausstrom aus der Kammer wurde mittels Gasmonitor kontrolliert und protokolliert.

Aufgrund der geringen Abweichungen von Gaskonzentration, Temperatur und Luftfeuchtigkeit von den entsprechenden Sollwerten kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen während der Versuche im *in vitro* Hypoxiemodell kontinuierlich unter recht exakten Bedingungen inkubiert wurden, und die Versuche zudem exakt wiederholbar waren.

2.5 Permeabilitätsmessung

2.5.1 Aufbau des *in vitro* Permeabilitätsmodells

Das *in vitro* Permeabilitätsmodell besteht aus mikroporösen Transwell® Polyester und Polycarbonat Membranen, die in 24-well-Platten eingesetzt werden (Abbildung 8). Die Zellen können auf der Membran anheften und einen konfluenten Monolayer bilden. Jedes well ist dann in eine apikale Kammer (oberhalb der Zellen) und eine basolaterale Kammer (unterhalb und seitlich der Zellen) unterteilt. Die Permeabilität der Zellen unter

verschiedenen Behandlungen kann nun durch die Messung der Passage eines Markers von der apikalen in die basolaterale Kammer bestimmt werden. Dazu wird eine bekannte Menge des Markers in die apikale Kammer gegeben und nach der Behandlung die Konzentration des Markers in der basolateralen Kammer bestimmt. Die mikroporöse Membran selber stellt für den Übertritt des Markers kein Hindernis dar und lässt diesen ungehindert passieren.

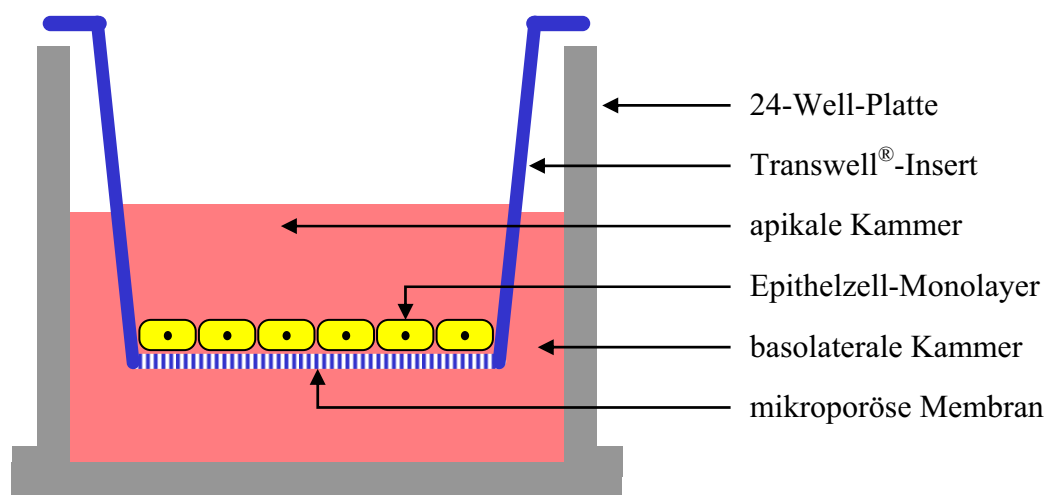


Abbildung 8: Schematische Darstellung des *in vitro* Permeabilitätsmodells

2.5.2 Durchführung der Permeabilitätsmessung

Die Transwell® Polyester und Polycarbonate Membranen wurden in die 24-well-Platten eingesetzt und für BMEC und CPE-Zellen wie oben beschrieben beschichtet. CSG- und MDCK-Zellen wuchsen auf unbeschichteten Transwell® Polycarbonate Membranen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die eingesetzte Zelldichte.

Zellen	Zelldichte
CSG	$6 \times 10^4 / \text{cm}^2$
CPE	1 g wet weight / 30 cm^2
MDCK	$5 \times 10^4 / \text{cm}^2$

Tabelle 1: Eingesetzte Zelldichte

Die Zellen wurden in 100 µl Kulturmedium aufgenommen und auf der Membran ausgesät. Um die Zellen auch von basolateral mit Medium zu versorgen und keinen hydrostatischen Druck auf die Zellen auszuüben, wurden 600 µl Kulturmedium in die basolaterale Kammer gegeben. Die Zellen wurden dann bis zur vollständigen Konfluenz im Brutschrank inkubiert.

Messung der Ionenpermeabilität

Da die Transwell® Polycarbonate Membranen nicht lichtdurchlässig sind und die Zellen somit nicht unter dem Mikroskop beurteilt werden konnten, wurde die Messung des elektrischen Widerstandes über den Monolayer durchgeführt. Dieser stellt ein Maß für die Ionenpermeabilität und damit für die Ausprägung der Interzellularverbindungen dar. Ein hoher Widerstandswert ließ auf die komplexe Ausbildung von Tight Junctions zwischen den Zellen und damit auf einen relativ dichten Monolayer schließen. Für die Widerstandsmessung wurde eine Elektrode des Messgerätes (Millicell Voltohmmessgerät) in das Zellmedium der apikalen Kammer, die andere Elektrode in das Zellmedium der basolateralen Kammer eingetaucht. CSG- und MDCK-Zellen wurden bei einem Widerstandswert von 500 Ωcm^2 für den Versuch verwendet.

Verwendung von Tritium-markiertem Inulin (^3H -Inulin) als Marker

Inulin ist ein Polysaccharid aus D-Fructose mit einem Molekulargewicht von 5,2kDa. Es passiert Zellmonolayer ausschließlich parazellulär. Wird es mit Tritium radioaktiv markiert, so lässt es sich als Marker einsetzen²¹¹.

^3H -Inulin wurde als Lyophilisat bezogen. Es wurde eine Vorratslösung der Konzentration 1 µCurie/µl in Wasser hergestellt und bei -20°C gelagert. Für die Versuche wurde die ^3H -Inulin Lösung 1:1000 in Kulturmedium verdünnt.

Die konfluenten Monolayer wurden zweimal mit warmen PBS gewaschen. Die apikale Kammer wurde dann mit 100 µl Kulturmedium, welches im Verhältnis 1:1000 mit ^3H -Inulin versetzt wurde, befüllt. Die basolaterale Kammer wurde mit 600 µl Kulturmedium befüllt. Wurden dem Kulturmedium bestimmte Agenzien zugesetzt, erfolgte dies sowohl für die apikale als auch für die basolaterale Kammer. Die Ansätze wurden nun für die entsprechende Zeit unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Nach der Behandlung wurden aus der basolateralen Kammer 50µl entnommen und in ein mit 4 ml Szintillationscocktail bestücktes

Szintillationsröhrchen überführt. Die Auswertung erfolgte im Szintillationscounter über die Messung des cpm-Wert (counts per minute). Pro Versuchsgruppe wurden 6 Transwell® Inserts eingesetzt. In jeder Versuchsgruppe wurden die cpm-Werte gemittelt und auf eine unbehandelte Kontrollgruppe bezogen. Ein gegenüber der Kontrollgruppe (100 %) erhöhter Wert sprach somit für eine erhöhte Permeabilität dieser Versuchsgruppe bezüglich [³H]-Inulin.

2.6 Proliferationsmessung

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Behandlungen auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Proliferationstests durchgeführt:

- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay: Bei diesem Test wird photometrisch die Reduktion eines Farbstoffes, die nur in lebenden Zellen stattfindet, bestimmt
- [³H]-Thymidin Messung: Hierbei wird der Einbau von [³H]-markiertem Thymidin in neu synthetisierte DNA gemessen

2.6.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Die Lösung enthält als Farbreagenz 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, MTS. Die Methode beruht nun auf einer Reduktion des blaß-gelben MTS in ein dunkel-braunes Formazanprodukt (Abbildung 9). Dieser Reduktionsschritt ist NADH/H⁺ beziehungsweise NADPH/H⁺ abhängig und findet folglich nur in lebenden Zellen statt. Die Farbänderung kann photometrisch bei 490nm gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

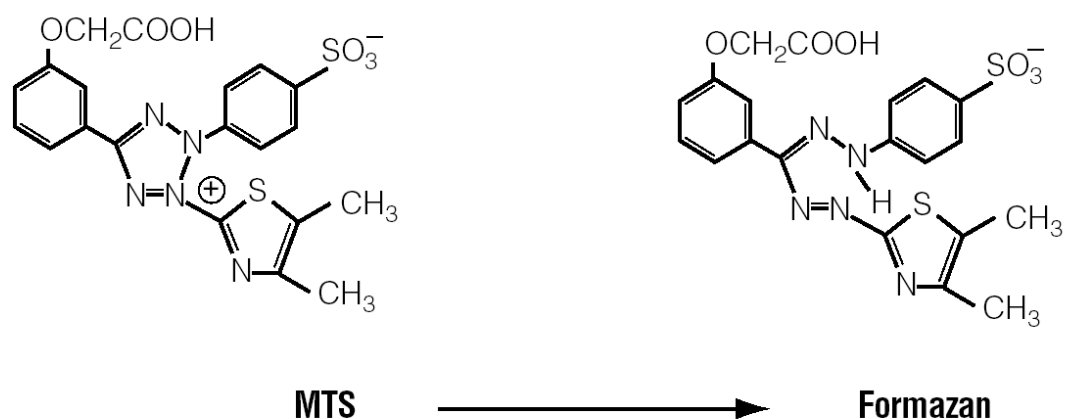


Abbildung 9: Struktur von MTS-tetrazolium und seinem Formazanprodukt

(Quelle: Promega)

Durchführung

Auf einer 96-Well-Platte wurden je Well 5×10^3 Zellen in 100 μl Medium ausgesät und dann bei 37°C für ein bis zwei Tage inkubiert. Bei einer Konfluenz von etwa 70% wurde mit dem Versuch begonnen. Zunächst wurde das Medium abgezogen und die Zellen einmal mit 200 μl warmen PBS gewaschen. Dann wurden 100 μl neues Medium mit den entsprechenden Zusätzen hinzugegeben. Es wurden je sechs well mit der gleichen Behandlung versehen ($n=6$). Die Zellen konnten nun für die vorher festgelegte Zeit unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert werden. Nach dieser Inkubation wurden je Well 20 μl der Farblösung hinzupipettiert und erneut für ein bis vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Darauf folgte die photometrische Messung bei 490nm (Biowave Photometer).

2.6.2 $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation

Dieser Test beruht auf der Tatsache, dass proliferierende Zellen neue DNA synthetisieren müssen. Bietet man den Zellen nun mit dem Medium radioaktiv markiertes Thymidin ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) als Baustein der DNA an, wird dieses eingebaut. Anschließend kann dann die Menge an eingebautem Tritium ($[^3\text{H}]$) gemessen werden. Diese ist proportional der Proliferation.

Durchführung

Auf einer 96-Well-Platte wurden je Well 5×10^3 Zellen in 100 μ l Medium ausgesät und dann bei 37°C für ein bis zwei Tage inkubiert. Bei einer Konfluenz von etwa 70% wurde mit dem Versuch begonnen. Zunächst wurde das Medium abgezogen und die Zellen einmal mit 200 μ l warmen PBS gewaschen. Dann wurden 100 μ l neues Medium mit [3 H]-Thymidin (0,5 μ Cu) und den entsprechenden Zusätzen hinzugegeben. Es wurden je sechs well mit der gleichen Behandlung versehen (n=6). Die Zellen konnten nun für die vorher festgelegte Zeit unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert werden. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit dem Filtermate Harvester geerntet. Dazu wurden die Zellen zunächst siebenmal mit Wasser gewaschen und anschließend in UniFilter[®]-96 gesogen. Die Filter wurden dann für fünf Stunden bei 37°C getrocknet. Danach wurde in jedes Filter-well 25 μ l Microscint[™] O gegeben. Die Messung der Szintilation erfolgte im TopCount NXT[™] mit 1 min/well.

2.7 Zytotoxizitätsmessung

Mit dem Zytotoxizitätstest sollte untersucht werden, ob die eingesetzten Behandlungen eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen haben und so zu irrtümlichen Ergebnissen bei den Permeabilitätsmessungen führen. Dieser Test wurde ebenfalls mit dem CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay durchgeführt.

Durchführung

Die Zellen wurden auf einer 96-well Platte ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz bei 37°C inkubiert. Erst dann folgte die entsprechende Behandlung. Wieder wurden je sechs well mit der gleichen Behandlung versehen. Die Zugabe der Farblösung und die photometrische Auswertung erfolgten wie oben beschrieben.

2.8 Molekularbiologische Untersuchungen

Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen war der qualitative und gegebenenfalls auch quantitative Nachweis von spezifischer DNA bzw. RNA in den Zellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 in den verschiedenen Epithelzellarten untersucht werden. Die Synthese neuer Zellproteine, in diesem Fall die Biosynthese der beiden VEGF-Rezeptoren, erfolgt durch Transkription der zuvor gebildeten RNA. Daher wurde zunächst die Expression der RNA, welche für die beiden VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 kodiert, in den verschiedenen Epithelzellen bestimmt. Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Schritte der molekularbiologischen Untersuchungen.

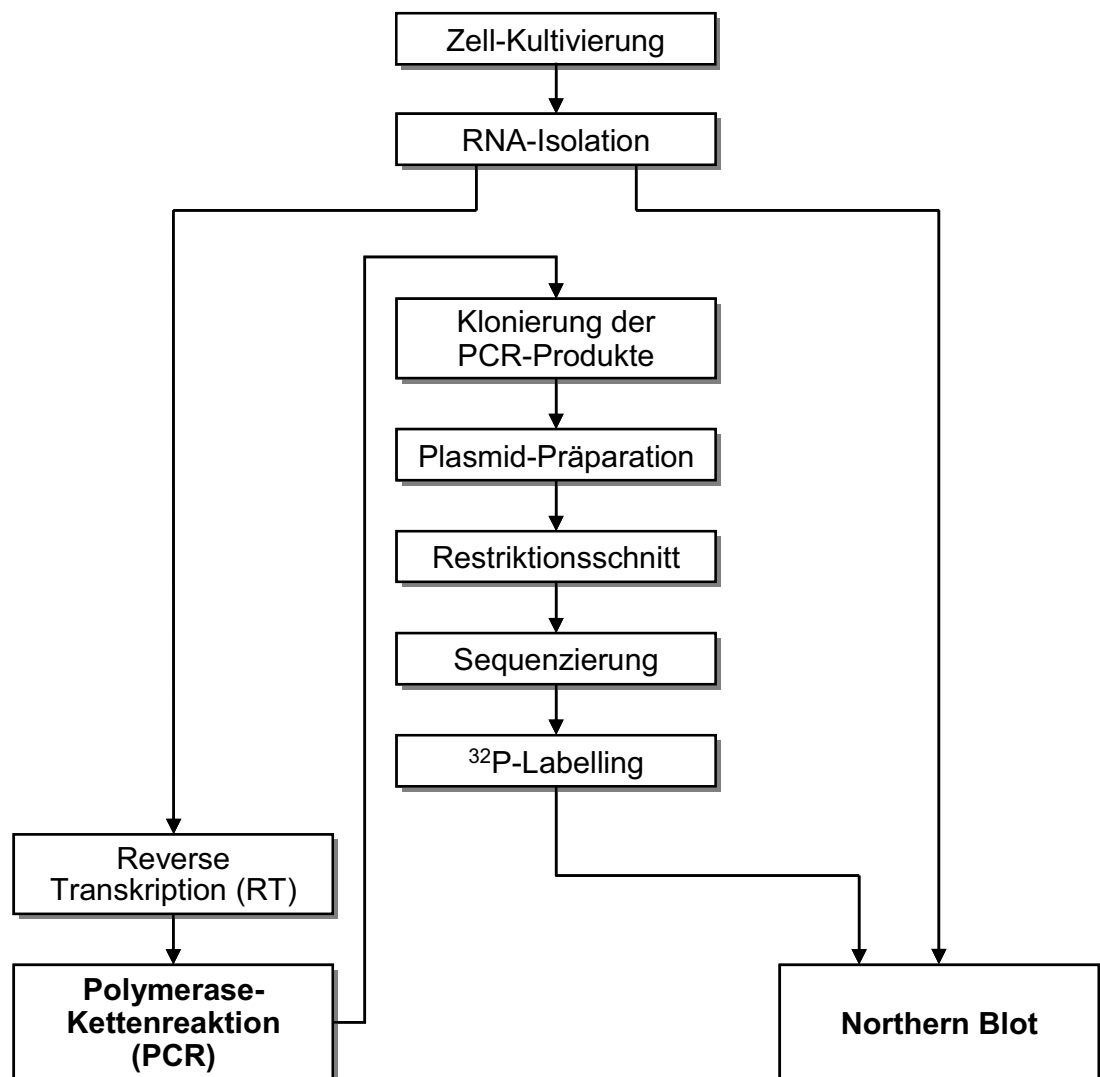


Abbildung 10: Überblick über die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen in schematischer Reihenfolge.

2.8.1 Isolierung von Total-RNA

Die Total-RNA wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert²¹².

Nach der spezifischen Behandlung wurden die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 650 µl Guanidiniumthiocyanatpuffer wurden die Zellen lysiert und konnten anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt werden und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt werden. Das Lysat wurde durch Aufziehen mit einer Injektionskanüle (22G) homogenisiert. Nach Zugabe von 65 µl Natriumacetat (2M, pH 4,0), 650 µl wassergesättigtes Phenol und 130 µl einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 49:1) wurden die Proben 30 Sekunden gevortext und anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde für 15 Minuten bei 13200 g und 4°C zentrifugiert. Die entstandene wässrige Oberphase wurde in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl kaltem Isopropanol versetzt. Nach einer Stunde bei -20°C wurden die Proben erneut zentrifugiert (15 min, 13200 g, 4°C) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde einmal durch Aufnehmen in 700 µl 70%igen Ethanol (-20°C), Abzentrifugieren (5 min, 13200 g, 4°C) und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 300 µl Guanidiniumthiocyanatpuffer und 300 µl Isopropanol aufgenommen und wieder eine Stunde bei -20°C gelagert, um die RNA zu präzipitieren. Die Proben wurden zentrifugiert (15 min, 13200 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal in 70%igen Ethanol gewaschen. Schließlich wurden die Proben im Vakuumtrokner getrocknet und in 15 µl Wasser aufgenommen. Nach der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 35 µl reinen Ethanols hinzugegeben. Die Proben wurden dann bei -80°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Probe kann über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt werden. Dabei werden Quarzküvetten benutzt, da Glas- oder Kunststoffküvetten Licht im UV-Bereich absorbieren.

Jeweils 1µl der aufbereiteten Nukleinsäure-Probe wurde mit 69µl Wasser verdünnt und die Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt.

Die Konzentration wurde errechnet nach:

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der unverdünnten RNA-Lösung

OD₂₆₀ = optische Dichte bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor (hier *V* = 70)

F = Multiplikationsfaktor (bei RNA-Proben ist *F* = 40, bei DNA-Proben ist *F* = 50)

Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ war ein Maß für die RNA-Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Da Proteine bei 280 nm absorbieren, war ein kleinerer Quotient ein Hinweis auf eine Proteinkontamination der Probe.

2.8.2 mRNA-Isolierung mit Dynabeads[®] Oligo (dT)₂₅

Der größte Teil der isolierten Total-RNA der Zellen besteht aus ribosomaler RNA (rRNA) und Transfer-RNA (tRNA). Nur etwa 1 – 5 % sind Messenger-RNA (mRNA). Da es aber bei den molekular-biologischen Untersuchungen um die Expression eben dieser mRNA ging, wurde eine mRNA Isolierung durchgeführt. Dazu wurden Dynabeads[®] Oligo(dT)₂₅ von Dynal Biotech benutzt.

Die mRNA eukaryotischer Zellen zeichnet sich, im Gegensatz zur rRNA und tRNA, durch einen am 3'-Ende angehängten Poly-(A)-Schwanz, bestehend aus 20 – 250 Adenosin Nukleotiden, aus. Dieser Umstand wird bei der mRNA Isolierung ausgenutzt.

Die Dynabeads[®] sind magnetische Kügelchen mit einem Durchmesser von 2,8 µm (±0,2 µm), an die eine oligo-dT-Sequenz gebunden ist. Die kann an den Poly-(A)-Schwanz der mRNA binden. Mit Hilfe eines Magneten können dann die Dynabeads[®] mit der gebundenen mRNA präzipitiert werden und die rRNA sowie die tRNA aus dem Ansatz herausgewaschen werden. Durch Erhitzen kann die Bindung von Dynabeads[®] und mRNA wieder gelöst werden²¹³.

Durchführung

Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml des Lysispuffers hinzugegeben, das Zelllysat mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Durch Aufziehen mit einer Injektionskanüle (22G) wurde das Lysat homogenisiert.

Mit Hilfe eines Magneten wurden 250 µl der Dynabeads® Oligo(dT)₂₅ einmal mit Lysispuffer gewaschen. Das Lysat wurde hinzugegeben und der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken inkubiert, damit die mRNA an die Dynabeads® binden konnten. Das Gefäß (1,5 ml Eppendorf) wurde an den Magneten gestellt, woraufhin sich die Dynabeads® mit der gebundenen mRNA an der Wand des Gefäßes sammelten. Der Überstand konnte dann vorsichtig abgesaugt werden. Anschließend wurde in der gleichen Weise zweimal mit Waschpuffer A und einmal mit Waschpuffer B gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Dynabeads® in 25 µl RNA-Probenpuffer suspendiert; für 2 min bei 85°C inkubiert und wieder an den Magneten gestellt. Die nun im Probenpuffer gelöste mRNA wurde abgezogen und in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert. Die Dynabeads® konnten dann mit 0,1M NaOH gewaschen und so bis zu viermal wiederbenutzt werden.

Sollte die mRNA für die RT-PCR benutzt werden, wurde die mRNA in 25 µl 10mM Tris/HCl, pH 7,5 eluiert. Außerdem wurden nur neue Dynabeads® verwendet, um eine Kontamination mit fremd mRNA und damit ein falsch positives Ergebnis auszuschließen.

2.8.3 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wurde zunächst ein der RNA komplementärer DNA Strang (cDNA) synthetisiert. Hierzu wurde die aus Retroviren isolierte reverse Transkriptase - eine RNA-abhängige DNA-Polymerase - sowie unspezifische hexamere Random-Primer verwendet. Spezifische DNA Fragmente der gebildeten cDNA konnten anschließend mit Hilfe der Taq-Polymerase und spezifischen Primern amplifiziert werden. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) umfasste einen Denaturierungsschritt, einen Annealingschritt und einen Elongationsschritt. Denaturiert wurde bei 94°C, dabei trennten sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wurde auf die Annealingtemperatur abgekühlt, so dass es zur Hybridisierung der im Überschuss

vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kam. Die Annealingtemperatur lag Primer-spezifisch etwa 10°C unterhalb der Schmelztemperatur (T_M) der Primer. Danach wurde die Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wobei der Primer verlängert wurde, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag, die der ursprünglichen Template-DNA exakt glich. Diese 3 Schritte wurden in einem speziellen Gerät (Thermocycler) 25 bis 35 mal wiederholt. Die DNA wurde anschließend mittels Ethidiumbromidfärbung im Agarosegel sichtbar gemacht.

Bei der Auswahl der Primersequenzen für die PCR wurde darauf geachtet, dass diese spezifisch mit der Zielsequenz hybridisierten. Die zur Primerwahl benötigten Sequenzen der jeweiligen RNA wurden entsprechenden Datenbanken entnommen (genbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Durch Computergestützten Homologievergleich der gewählten Primersequenzen mit entsprechenden Datenbanken (Blast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden unspezifische Hybridisierungen ausgeschlossen.

Als Primer wurden verwendet:

Flt-1 forward: 5' - CTG CCA CTC TCA TTG TAA ACG - 3'

Flt-1 reverse: 5' - GAC AGT TTC AGG TCC TCT CC - 3'

Flk-1 forward: 5' - GTT TGC AAG AAC TTG GAT GCT C - 3'

Flk-1 reverse: 5' - CCT GGC AGG TGT AGA GGC C - 3'

Durchführung

Reverse Transkription:

Aus den Ansätzen der mRNA-Isolierung wurden 10,5 µl aliquotiert und mit 1 µl dNTP Mix und 0,5 µl Random-Primer (3 µg/µl) versetzt. Die Proben wurden dann für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und sofort wieder auf Eis gelagert. Dadurch wurde die Bildung von Sekundärstrukturen in der RNA verhindert. Nun wurden 4 µl 5x First-Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1M), 1 µl RNasin® und 1 µl Superscript™ II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (200 units) hinzupipettiert und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren alles gut durchgemischt. Damit die Random-Primer an die RNA binden konnten, wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Hiernach wurde für 50

Minuten bei 42°C, dem Temperaturoptimum der reversen Transcriptase, inkubiert. Durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten wurde die Transcriptase inaktiviert und damit die Reaktion gestoppt. Die synthetisierte cDNA konnte nun direkt als Template für die PCR genutzt oder bei 4°C gelagert werden.

Polymerasekettenreaktion (PCR):

Die PCR wurde mit dem Taq PCR Core Kit (*Qiagen GmbH*) nach den Angaben des Herstellers mit 1–2 µl cDNA und je 0,5µl Primer durchgeführt.

Programm:	2 min	94°C	
	30 sec	94°C (Denaturierung)	} 35 Durchgänge
	30 sec	56°C (Annealing)	
	60 sec	72°C (Elongation)	
		4°C (Lagern)	

2.8.4 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, Nukleinsäuren (RNA und DNA) ihrer Kettenlänge nach aufzutrennen. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Dabei gelangen kleine Moleküle schneller durch die Poren des Agarosegels als große Moleküle. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, das sowohl an DNA als auch an RNA bindet, können die Nukleinsäuren anschließend im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ab einer Nukleinsäuremenge von mindestens 25 ng kann eine Bande erkannt werden²¹⁴.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1% Agarose in 1x TBE-Puffer eingewogen und aufgeköcht. Der Lösung wurde nach Abkühlung auf 50°C Ethidiumbromid zugesetzt und in eine Elektrophoresekammer mit Kamm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde die Kammer mit 1x TBE-Puffer übergossen und die DNA mit DNA-Probenpuffer in die Taschen geladen. Die Elektrophorese wurde mit 10 V/cm durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit dem GeneGenius System von Syngene fotografisch dokumentiert.

2.8.5 Elution der DNA aus dem Agarosegel

Um DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu eluieren, wurde das UltraClean™ 15 DNA Purification Kit der Firma MoBio Laboratories Inc. benutzt. Nach der Elektrophorese wurde die entsprechende DNA-Bande ausgeschnitten und die Agarose irreversibel in einer chaotropischen Salz-Lösung geschmolzen. Die DNA konnte derweil an die zugegebenen Silica-Partikel binden. Der Silica/DNA Komplex wurde pelletiert und die geschmolzene Agarose verworfen. Nach einem Waschschrift konnte die DNA in Wasser aufgenommen werden. Die Elution wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration und die mögliche Verunreinigung des Eluates wurden photometrisch anhand der OD₂₆₀ und OD_{260/280} bestimmt.

2.8.6 Einbau der PCR-Produkte in einen Vektor

Um die PCR-Produkte in größerem Maße zu vermehren und dauerhaft haltbar zumachen, wurden sie in einen Vektor einkloniert und in kompetente Bakterienstämme transformiert. Der verwendete pGEM®-T Easy Vektor (Abbildung 11) enthielt unter anderem eine Ampicillinresistenz und das lacZ'Gen. Dadurch konnte später eine Selektion der richtigen Kolonien vorgenommen werden.

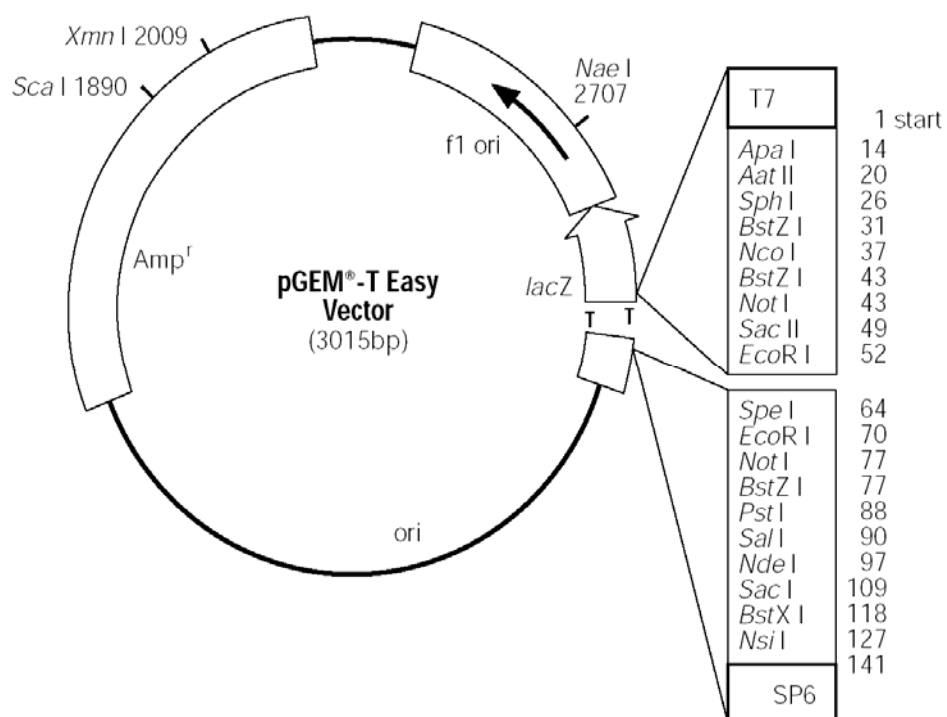


Abbildung 11: Schematische Darstellung des pGEM®-T Easy Vektors (Quelle: Promega)

Die Ligation der PCR-Produkte wurde mit dem pGEM[®]-T Easy Vektor Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Da die Taq-Polymerase an die 3'-Enden der PCR-Fragmente jeweils ein überhängendes dA-Nukleotid anhängt, können diese DNA-Fragmente direkt in einen geöffneten T-Vektor ligiert werden, der komplementäre dT-Überhänge aufweist.

2.8.7 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien des Stammes JM109 wurden auf Eis aufgetaut. 10-100 ng der Plasmid-DNA wurden zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte bei 42°C ein Hitzeschock für 45 sec. 1 ml LB-Medium wurde zu den Bakterien gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, die darin kodierte Ampicillinresistenz aufbauen. Der Ansatz wurde anschließend pelletiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert, mit dem Drygalskispatel auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dadurch konnten Bakterien, bei denen die Transformation nicht erfolgreich war, ausgesiekt werden.

2.8.8 Blau-Weiß-Differenzierung

Um nur solche Bakterien auszuwählen, bei denen das PCR-Fragment auch tatsächlich in den Vektor eingebaut wurde, wurde eine Blau-Weiß-Differenzierung durchgeführt. Der verwendete pGEM[®]-T Easy Vektor trägt um die multiple Klonierungssequenz herum das lacZ' Gen, der verwendete Bakterienstamm JM109 kodiert für den C-Terminus der β -Galactosidase.

Auf einer LB-Platte wurden mit Hilfe eines Drygalskispatels 40 µl X-Gal (20 ng/ml) und 4 µl IPTG (200 ng/ml) gleichmäßig verteilt und bei 37°C mindestens 1 h vor dem Ausstreichen des Transformationsansatzes inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37°C konnten weiße von blauen Kolonien unterschieden werden. Bakterien, die ein Plasmid mit einem intakten lacZ' Gen tragen, sind in der Lage das künstliche Substrat X-Gal zu spalten und bilden daher blaue Kolonien. Durch Klonierung eines Fragmentes in die multiple Klonierungssequenz ist das lacZ' Gen inaktiv und die Bakterien, die es enthalten, sind daher weiß.

2.8.9 Plasmidpräparation

Zur Vermehrung der erhaltenen Klone wurden Mini- und Midikulturen angelegt. Mit einer autoklavierten Pipettenspitze wurde eine weiße Kolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium gegeben. Aus dieser Minikultur wurden 10 µl zu 50-100 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt.

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach der Herstelleranleitung des Wizard® Plus Mini/Midiprep Purification system.

2.8.10 Anlegen von Glycerinstocks der Bakterienklone

850 µl einer transformierten Bakterienkulturlösung wurden mit 150 µl Glycerin gemischt und bei –80°C gelagert. Um gelagerte Klone wieder in Kultur zu bringen, wurden diese mit einer ausgeglühten Impföse auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte mit der oben beschriebenen Plasmidpräparation fortgefahren werden.

2.8.11 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen in der DNA und schneiden so, dass ein 5', 3'-Überhang oder glatte Enden entstehen. Bei dem verwendeten pGEM®-T Easy Vektor wurde EcoR I als Endonuklease benutzt.

30-50 µg Plasmid-DNA wurden 10 µl EcoR I und 10 µl Multi Core Buffer (10x) zugesetzt und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann für mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die geschnittene DNA wurde dann in einem 1,3% Agarosegel elektrophoretisch getrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel eluiert.

2.8.12 DNA-Sequenzierung nach Sanger

DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der DNA-Sequenz, d.h. der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül. Es wurde dazu des AutoRead™ Sequencing Kit von PharmaciaBiotech verwendet und der A.L.F. DNA Sequencer eingesetzt.

Das Prinzip dieser Sequenzierung beruht auf dem Einsatz von Didesoxynukleotiden, die aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zur vorzeitigen Termination der DNA-Synthese führen. Einzelsträngige DNA dient als Matrize. Ein Primer mit freier 3'-OH-Gruppe ist komplementär zu einer kurzen Sequenz, davon ausgehend synthetisiert eine DNA-Polymerase die DNA-Stränge. Dem Reaktionsansatz wurden neben den Desoxynukleosidtriphosphaten aller vier Basen (dNTPs) auch Fluoreszenz-Farbstoff markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugegeben. Den Didesoxynukleosidtriphosphaten fehlte die 3'-OH-Gruppe. Sie wurden von der DNA-Polymerase wie die Desoxynukleosidtriphosphate eingebaut, führten dann jedoch zum Kettenabbruch. Durch den statistisch verteilten Kettenabbruch entstand ein Gemisch aus Fragmenten verschiedener Länge. Alle Fragmente hatten das gleiche 5'-Ende, aber verschiedene 3'-Enden. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigten dadurch Fluoreszenzen unterschiedlicher Farbe und konnten so von einem Detektor erkannt werden. Computergestützt konnte dann daraus letztlich die DNA-Sequenz errechnet werden.

2.8.13 Northern Blot

Beim Northern-Blot wird elektrophoretisch aufgetrennte RNA durch kapillare Kräfte aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran ist positiv geladen und ermöglicht so eine elektrostatische Bindung der negativ geladenen RNA. Eine kovalente und damit dauerhafte Bindung der RNA an die Nylonmembran erfolgte durch sogenanntes „cross-linken“ mit UV-Licht. Dieses aktiviert Thymin- und Uracilreste der RNA, die daraufhin mit den primären Amingruppen der Nylonmembran reagieren.

Durchführung

Für die RNA-Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Formaldehyd-Agarosegel verwendet. Dazu wurden 2,5 g Agarose in 210 ml Wasser eingewogen und aufgeköcht. Nach Zugabe von 25 ml MOPS-Lösung (10x) und 13 ml Formaldehyd (37%ig) wurde die Lösung in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach Abkühlen und Auspolymerisieren des Gels wurde dieses mit MOPS-Lösung (1x) übergossen.

Für die elektrophoretische Auftrennung von Total-RNA wurden 15 µg der RNA im Vakuumtrockner getrocknet und in 20 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen. Die mRNA-Proben wurden in RNA-Probenpuffer eluiert und konnten somit direkt verwendet werden. Zur Denaturierung der RNA wurden die Proben 10 min bei 65°C unter Schütteln inkubiert und konnten dann auf das Gel aufgetragen werden.

Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Die Laufzeit betrug etwa 3 Stunden. Nach der Gelelektrophorese wurde die Qualität der isolierten RNA unter UV-Licht beurteilt und mit Hilfe des GeneGenius von Syngene fotografisch dokumentiert. Das Gel wurde anschließend in 2x SSC-Lösung gewaschen.

Für die Blot-Apparatur wurde Zellstoff auf einer Kunststoffplatte etwa 10 cm hoch gestapelt. Hierauf wurden zwei Lagen mit 10x SSC-Lösung getränktes 3MM-Papier, die Nylonmembran Duralon UV™ sowie das RNA-Gel luftblasenfrei aufgelegt. Zwei lange Streifen 3MM-Papier wurden in 10x SSC-Lösung getränkt und so, ebenfalls luftblasenfrei, auf das Gel gelegt, dass ihre Enden in den Wannen mit 10x SSC-Lösung zu liegen kamen. Eine Kunststoffplatte und ein Gewicht, etwa 1,5 Kg, bildeten den Abschluss nach oben. Geblottet wurde über Nacht (etwa 16 Stunden) bis der Zellstoffstapel vollständig mit SSC-Lösung getränkt war (Abbildung 12).

Die Membran wurde anschließend in 2x SSC-Lösung gewaschen und zwischen zwei Lagen 3MM-Papier getrocknet. Unter UV-Licht konnten die 18S- und die 28S-rRNA-Banden sowie die RNA-Marker beurteilt und auf der Membran markiert werden. Die Fixierung der RNA auf der Nylonmembran erfolgte in einem UV-Stratalinker durch „cross-linken“.

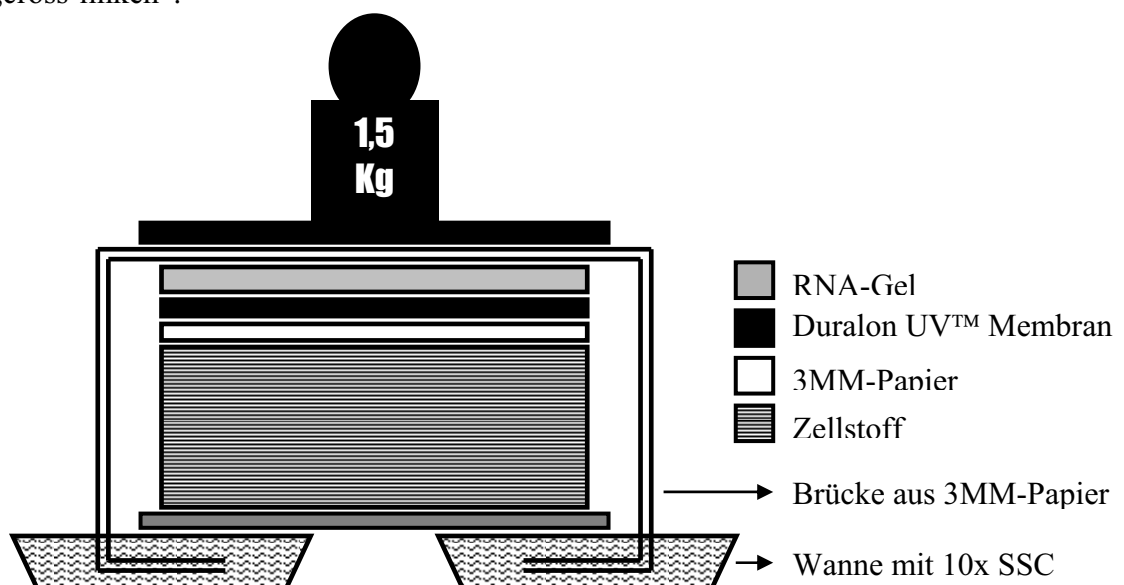


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Northern Blot Apparatur

2.8.14 ³²P-Markierung von cDNA-Sonden

cDNA-Sonden wurden mittels „random priming“ radioaktiv markiert. Es wurde der rediprime II™, RandomPrime Labeling Kit verwendet.

Das Prinzip des random priming beruht darauf, dass Hexanukleotide verschiedenster Basenfolge mit dem zu markierenden Fragment hybridisieren und so dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase als Start dienen. Die Polymerase synthetisiert dann einen komplementären Strang, wobei radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut werden, in diesem Fall das α -³²P dCTP.

Durchführung

Für die Markierung wurden 50 ng DNA in einem Volumen von 46 μ l für 5 min bei 100°C denaturiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Ansatz in das Reaktionsgefäß des rediprime-Kits, welches das Klenow-Fragment, Hexanukleotide, dATP, dTTP und dGTP enthält, überführt. Dann wurden 4 μ l α -³²P dCTP hinzugefügt und mindestens 10 min bei 37°C inkubiert.

Zur Quantifizierung der Markierungsreaktion, d.h. zur Messung der Menge an eingebautem radioaktivem Nukleotid, wurde 1 μ l des Ansatzes auf einen Streifen Whatman DE81-Papier, welcher zwischen zwei Objektträgern eingeklemmt wurde, gegeben und in eine Pufferwanne mit 0,5M KH₂PO₄ gehängt. Freie, nicht eingebaute Nukleotide wandern schneller als das zu markierende bzw. das markierte Fragment. Nach dem Trocknen des Streifens wurde dieser etwa 1cm unterhalb der Auftragsstelle durchgeschnitten, oberer und unterer Abschnitt in verschiedene Szintillationsröhrchen gegeben und die Zerfälle pro Minute (counts per minute, cpm) im Betacounter gemessen. Aus dem Verhältnis oberer Abschnitt (markierte Fragmente) und Gesamtaktivität (unterer Abschnitt (freie Nukleotide) + oberer Abschnitt) konnte dann die Einbaurate errechnet werden. Sie sollte mindestens 30% betragen und die Hybridisierungslösung sollte mindestens 1 mio counts pro ml enthalten.

Einbau = $\text{cpm [oberer Abschnitt]} / (\text{cpm [oberer Abschnitt]} + \text{cpm [unterer Abschnitt]})$

2.8.15 Hybridisierung mit cDNA-Sonden

Hybridisierungen von Northern Blots mit cDNA-Sonden erfolgten nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Membran. Zunächst wurde mit 10 ml Hybridisierungspuffer pro Membran für mindestens 2 h bei 42°C prähybridisiert. Nach Zugabe der ^{32}P -markierten cDNA-Sonden wurde über Nacht bei 42°C hybridisiert. Hiernach wurde die Membran stringent gewaschen, wobei mit 2x SSC / 0,1% SDS bei RT begonnen wurde und je nach Sonde und Stringenz die Salzkonzentration verringert oder die Temperatur erhöht wurde. Die feuchte Membran wurde dann in Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht in einer PhosphorImager-Kassette oder auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Auswertung der Blots erfolgte mit dem Gene Genius BioImaging System.

2.8.16 Strippen der Northern Blots

Nach der Auswertung wurden die Northern Blot Membranen gestrippt und konnten dann mit einer anderen ^{32}P -markierten Sonde hybridisiert werden. Dazu wurde die Membran für 45 min bei 80°C in ausreichend 0,1 %iger SDS-Lösung geschwenkt. Die feuchte Membran wurde dann in Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht in einer PhosphorImager-Kassette exponiert. So konnte sichergestellt werden, dass keine markierten Sonden mehr an dem Blot gebunden waren.

2.9 Proteinanalyse

2.9.1 Proteinisolierung aus Zellen

Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Proteinlysis-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei 4°C wurde das Zelllysate mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit einer Injektionskanüle (22G) homogenisiert. Dann wurden die Proben bei 13000 g, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde verworfen.

2.9.2 Bestimmung des Proteingehalts

Um die Western Blots gleichmäßig beladen zu können, war es vonnöten, den Proteingehalt in den Proben zu bestimmen. Dazu wurde der DC Protein Assay von Biorad benutzt. Die Methode beruht auf einer von Lowry beschriebenen Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfertartratlösung und dem Folinreagenz²¹⁵. Wie beim Lowry assay sind zwei Schritte für die Farbentwicklung nötig: Die Reaktion zwischen Protein und Kupfer in alkalischer Lösung und die daran anschließende Reduktion des Folinreagenzes durch das kupferbehandelte Protein. Eine Farbentwicklung ist hauptsächlich auf die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und weniger auf Cystein und Histidin zurückzuführen²¹⁶. Proteine erzielen eine Reduktion des Folinreagenzes durch Verlust eines, zweier oder dreier Sauerstoffatome. Dadurch werden eine oder mehrere mögliche reduzierte Formen des Folinreagenzes mit charakteristischer Blaufärbung mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm und einem Absorptionsminimum bei 405 nm erzielt.

Die Durchführung des Protein-Assay erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Standardkurve wurde bovines Serumalbumin (BSA) in acht verschiedenen Konzentrationen von 0–1400 µg/ml eingesetzt. Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Software Magellan™ von TECAN.

2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die Proteine werden dabei durch das dem Polyacrylamidgel zugesetzte amphipathische SDS negativ geladen und bilden ein Protein-SDS-Komplex, dessen Gesamtladung der Größe des Proteinmoleküls proportional ist. Im elektrischen Feld des SDS-Polyacrylamidgels bewegen sich die negativ geladenen Proteinkomplexe daher zur Anode hin. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und wird durch die Porengröße des Gels, abhängig von der Polyacrylamid-Konzentration, und der angelegten Spannung bestimmt.

Verwendet wurden die 6% Tris-Glycin Fertiggele der Firma *Anamed* sowie die 10% Bis/Tris Fertiggele der Firma *Invitrogen*.

Durchführung

Aus den Proben wurden je 25 µg Protein im Vakuumtrockner eingetrocknet und anschließend in 15 µl Sample-Buffer – SDS-Proben-Puffer bei 6% Tris-Glycin Gelen und NuPAGE® LDS Buffer bei 10% Bis/Tris Gelen – aufgenommen. Durch Erhitzen wurden die Proteine denaturiert. Anschließend wurde die gesamte Menge in die Taschen der Fertiggele transferiert. Zusätzlich wurde als Größenmarker der Rainbow™ coloured protein molecular weight marker, *Amersham* aufgetragen. Spannung und Laufpuffer waren vom Gel abhängig und wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.9.4 Western Blot

Mit der Technik des Western Blot ist es möglich, die im SDS-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran zu übertragen und dann später mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren. Die Übertragung erfolgt wiederum durch eine angelegte Spannung. Die Bindung der Proteine an die Nitrozellulose basiert auf elektrostatischer- und Wasserstoffbrückenbindung.

Die Durchführung des Western Blot erfolgte in einer Naßblotkammer von *Invitrogen* nach den Angaben des Herstellers. Abbildung 13 zeigt schematisch den Aufbau der Kammer.

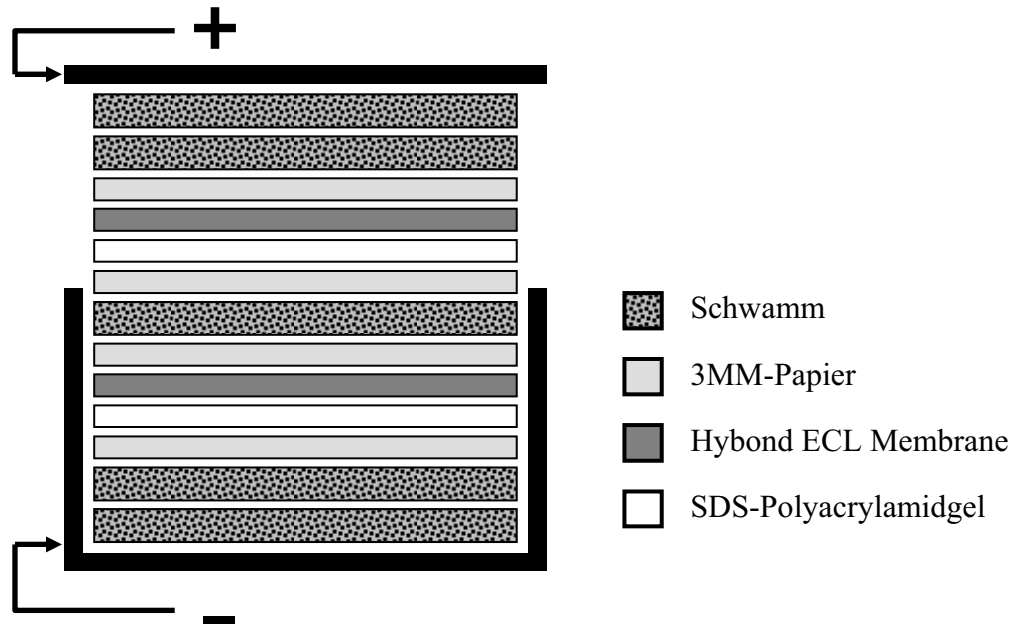


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Naßblotkammer von *Invitrogen*

2.9.5 Ponceaufärbung

Bei der Ponceaufärbung handelt es sich um eine reversible Anfärbung aller Proteine auf der Nitrozellulose-Membran. So konnte beurteilt werden, ob tatsächlich gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, das Gel eine gute Auftrennung der Proteine aufwies und die Proteine auch auf die Nitrozellulose-Membran übertragen wurden.

Hierzu wurde die Membran mit Ponceaulösung überschichtet. Nach etwa 3 Minuten wurde die überschüssige Lösung mit Wasser entfernt und es stellten sich rot gefärbte Proteinbanden dar. Zur Dokumentation wurde die Membran gescannt und anschließend die Färbung mit reichlich Wasser abgewaschen.

2.9.6 Spezifische Immunreaktion und ECL-Detektion

Bei dieser Methode binden spezifische Antikörper an die zu detektierenden Proteine auf der Nitrozellulose-Membran. Nach einem Waschschrift wird ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und mit einem Enzym, der Horseradish Peroxidase (HRP), konjugiert ist, hinzugegeben. Die Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen zunächst die Reduktion von Hydrogenperoxid, welches daraufhin Luminol oxidiert, wodurch eine Chemielumineszenz bei einer Wellenlänge von ca. 428 nm entsteht. Ein gegen die Nitrozellulose-Membran exponierter blauecht-sensitiver Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, *Amersham*) stellt nach seiner Entwicklung die detektierten Proteine als schwarze Banden dar (Abbildung 14).

Um Hintergrundsignale, die durch unspezifische Bindung zwischen Antikörper und Nitrozellulose-Membran entstehen, zu verhindern, wurde mit Milch oder Rinder Serumalbumin (BSA) geblockt.

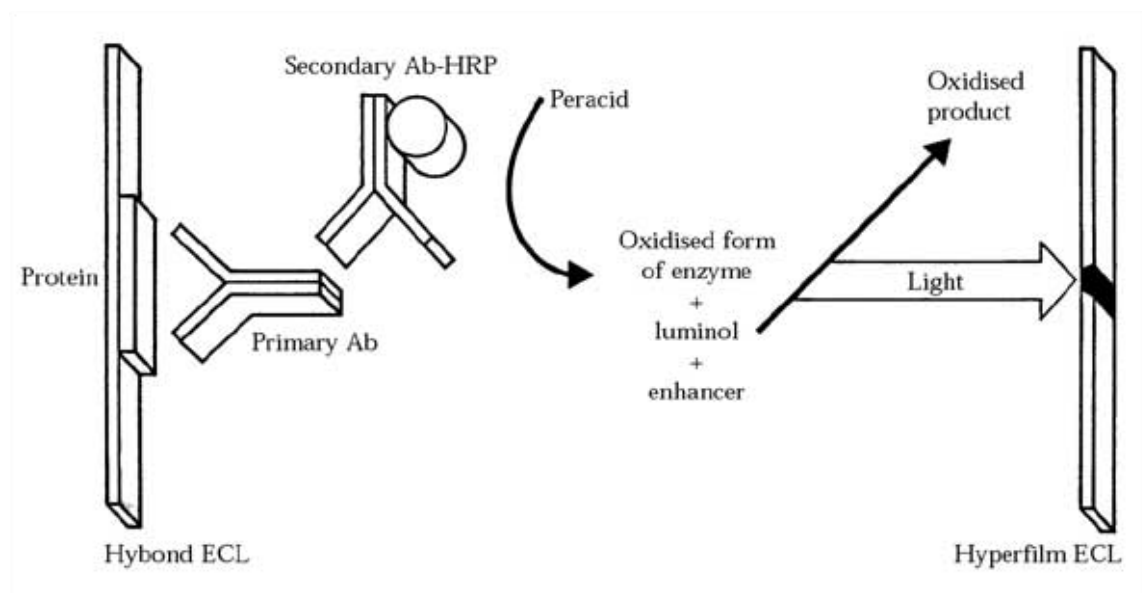


Abbildung 14: Prinzip des ECL-Detektionssystem (Quelle: Amersham)

Durchführung

Der Filter wurde 1 h bei RT mit 5% Milch in TBS-T geblockt und anschließend ÜN mit dem ersten Antikörper, verdünnt in 5% Milch in TBS-T, bei 4°C inkubiert. Danach wurde zweimal kurz und dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% Milch in TBS-T zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden durch Waschen mit TBS (zweimal kurz,

dreimal 10 min) die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Nun folgte die ECL-Detektion, die nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die Filter wurden dann luftblasenfrei in Saranwrapfolie eingepackt. Die Belichtungszeit der Röntgenfilme lag je nach gesuchtem Protein und verwendetem Detektionssystem zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten.

Eine Liste der verwendeten Antikörper und der eingesetzten Verdünnungen findet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.9.7 Strippen der Western Blots

Durch Strippen mit wenigen ml Stripping-Puffer bei 50 °C für 20 Minuten konnte die Protein-Antikörper Bindung aufgehoben werden und der Filter anschließend mit einem anderen Antikörper behandelt werden. Auf diese Weise wurde jeder Filter mit bis zu drei Antikörpern behandelt.

2.10 Immunzytochemie

Bei der Immunzytochemie werden zunächst die Zellen fixiert und anschließend permeabilisiert. Dann wird mit einem spezifischen Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, inkubiert. Nach Entfernen der nicht gebundenen Antikörper durch mehrfache Waschschrte wird mit einem zweiten Antikörper, der gegen das IgG des ersten Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Dieser zweite Antikörper ist Cy³-konjugiert und zeigt so bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht im Bereich von 525–560 nm eine starke Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop.

Durchführung

Die Zellen wurden auf 8-Kammer Objektträgern ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die entsprechende Behandlung.

2.10.1 Bindung des 1. und 2. Antikörpers

Nach der Behandlung wurde wieder das Medium abgezogen und erneut mit PBS gewaschen. Es folgte dann die Fixierung des Monolayers mit 1% Paraformaldehyd (5 min bei 37°C). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,05% Triton (in PBS) permeabilisiert (5 min bei 37°C) und wieder zweimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers zu vermeiden, wurde für mindestens 30 Minuten mit 10% Serum der Herkunftsspezies des zweiten Antikörpers inkubiert. In diesem Falle handelte es sich dabei überwiegend um Goat-Serum.

Nach erneutem Waschen wurde dann der erste Antikörper in der entsprechenden Verdünnung aufgetragen und für 60 Minuten bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert. In drei Waschschritten (3, 5 und 10 Minuten) wurden die nichtgebundenen Antikörper heruntergewaschen. Hiernach wurde der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in PBS aufgetragen und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Wieder wurde dreimal mit PBS gewaschen (3, 5 und 10 Minuten).

Eine Liste der verwendeten Antikörper und der eingesetzten Verdünnungen findet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.10.2 Kernfärbung

Sollte eine Kernfärbung durchgeführt werden, wurde hierzu 4,6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI) 1:4000 in PBS verdünnt und für 1 Minute aufgetragen. Anschließend wurde mehrfach mit PBS gewaschen.

2.10.3 Eindeckeln der Präparate

Eingedeckelt wurden die Präparate mit Mowiol. Da Mowiol eine sehr geringe Eigenfluoreszenz aufweist, ist es besonders geeignet für die Immunzytochemie.

Für die Herstellung der Mowiol-Lösung wurde 1 g Mowiol in 4 ml PBS bei pH 8,0 unter 16stündigem Rühren bei RT gelöst. Nach Zugabe von 2 ml wasserfreiem Glycerin wurde für weitere 16 Stunden gerührt. Nach Entfernung ungelöster Mowiolreste durch Zentrifugation konnte die Lösung bei 8°C gelagert werden.

Ein Tropfen des sehr zähflüssigen Mowiol wurde auf das Präparat aufgetragen und dann ein geschliffenes Deckglas vorsichtig aufgelegt und ganz leicht angedrückt. Die Objektträger wurden dann in einer lichtdichten Kammer bei 4°C ÜN gelagert. In dieser Zeit konnte das Mowiol aushärten.

2.10.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die optische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Mikroskop der Firma Leica mit den Immersionsobjektiven 63x und 100x (MPL Fluotar 63/0,75 Oil und 100/1,0 Oil). Licht lieferte eine 50 W Quecksilberhochdrucklampe der Firma Osram, Typ HBO 50 W. Es wurden die Okulare Periplan GW 10x eingesetzt. Um die Präparate zur Fluoreszenz anzuregen, fand das Verfahren der Auflichtfluoreszenz Verwendung.

2.10.5 Kontrollpräparate

Um eine mögliche unspezifische Bindung des 2. Antikörpers mit Antigenen der Zellen zu erkennen wurden Negativkontrollen durchgeführt. Hierbei wurden die Präparate lediglich mit dem 2. Antikörper ohne vorherige Inkubation mit dem 1. Antikörper behandelt. Alle anderen Schritte erfolgten wie beschrieben.

Bei keinem der durchgeführten Tests zeigte sich dabei eine unspezifische Bindung des 2. Antikörpers.

2.11 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM ausgedrückt. Zur Ermittlung von statistischen Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen wurde der unpaired t-Test bei unbekannter Varianz durchgeführt. Ein P-Wert $< 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe wurde als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität an Endothelzellen

Viele vorausgegangene *in vitro* und *in vivo* Studien zeigten bereits, dass Hypoxie an Endothelzellen eine Hyperpermeabilität bewirkt. Weiter konnte gezeigt werden, dass diese Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität über VEGF vermittelt wird. VEGF wirkt über eine Bindung an einen seiner beiden Tyrosin-Kinase-Rezeptoren Flt-1 oder Flk-1. Welcher der beiden Rezeptoren nun verantwortlich ist für die Vermittlung der permeabilitätssteigernden Wirkung von VEGF wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Zur Klärung dieser Frage wurden mikrovaskuläre Gehirnendothelzellen vom Schwein (BMEC) mit verschiedenen Subtypen von VEGF, welche unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den beiden VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 aufweisen, behandelt.

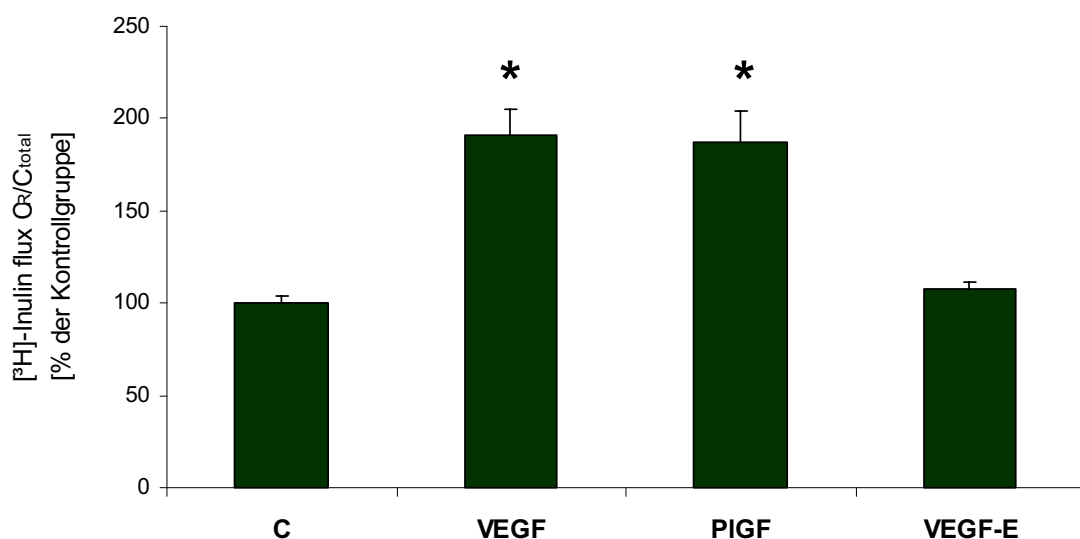


Abbildung 15: VEGF und PlGF, aber nicht VEGF-E erhöhen die Permeabilität des BMEC-Monolayer gegenüber [³H]-Inulin.

Der BMEC-Monolayer wurde für 3h mit VEGF (10ng/ml), PlGF (10ng/ml) und VEGF-E (10ng/ml) behandelt. Allen Ansätzen wurde das Antioxidans α -LA zugesetzt. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen (Normoxie, keine Zugabe von Agenzien) wurden auf 100% gesetzt (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; n=24, *p<0,05 bezüglich der Kontrollgruppe).

PlGF, das lediglich an Flt-1 bindet, erhöhte dabei die Permeabilität des Endothelzellmonolayers in gleicher Weise wie VEGF. Das virale VEGF-Homolog VEGF-E, das nur an Flk-1 bindet, bewirkte keine Änderung der Permeabilität (Abbildung 15).

Die Ergebnisse ließen somit vermuten, dass die VEGF-induzierten Veränderungen der Permeabilität am BMEC-Monolayer durch Aktivierung von Flt-1, und nicht von Flk-1, vermittelt werden.

Um diese Vermutung zu untermauern, wurden Versuche mit Antisense (AS) - Oligonukleotiden durchgeführt. AS-Oligonukleotide sind kurzkettige synthetische Nukleinsäuren. Der Name nimmt darauf Bezug, dass ihre Basensequenz entgegengesetzt zu einer funktionalen mRNA ist. Sie binden über Watson-Crick-Basenpaarung an eine komplementäre mRNA (die Sense-mRNA). Durch die spezifische Bindung des AS-Oligonukleotids an die mRNA für das Zielprotein wird durch Blockieren der Translation letztlich die Synthese des betreffenden Proteins verhindert. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden der Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) entnommen.

Neben den AS-Oligonukleotiden gegen Flt-1 und Flk-1 wurden als Negativ-Kontrolle auch sogenannte scrambled (scr) oder Nonsense-Oligonukleotide verwendet. Diese enthielten die Nucleotide in gleicher Anzahl und gleichem Verhältnis wie die Flt-1-AS bzw. Flk-1-AS, jedoch in anderer Reihenfolge. So konnten unspezifische Veränderungen durch die Zugabe der Oligonukleotide ausgeschlossen werden.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, konnte durch die Zugabe von Flt-1-AS die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität inhibiert werden, wohingegen die Zugabe von Flk-1-AS keinen Einfluss auf die Permeabilität des BMEC-Monolayer unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe hatte. Auch die Negativ-Kontrollen mit scr Flt-1-AS und scr Flk-1-AS zeigten keine Veränderung der Hyperpermeabilität.

Mittels Western Blot Analyse konnte dann gezeigt werden, dass die Zugabe der spezifischen AS-Oligonukleotide tatsächlich die Expression der beiden VEGF-Rezeptoren deutlich verminderte, wenn auch nicht ganz aufhob (Abbildung 16 B). Die Zellen wurden dazu zunächst bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der AS-Oligonukleotide für 48 h. Die Durchführung des Western Blot erfolgte wie in Kapitel 2.9 beschrieben.

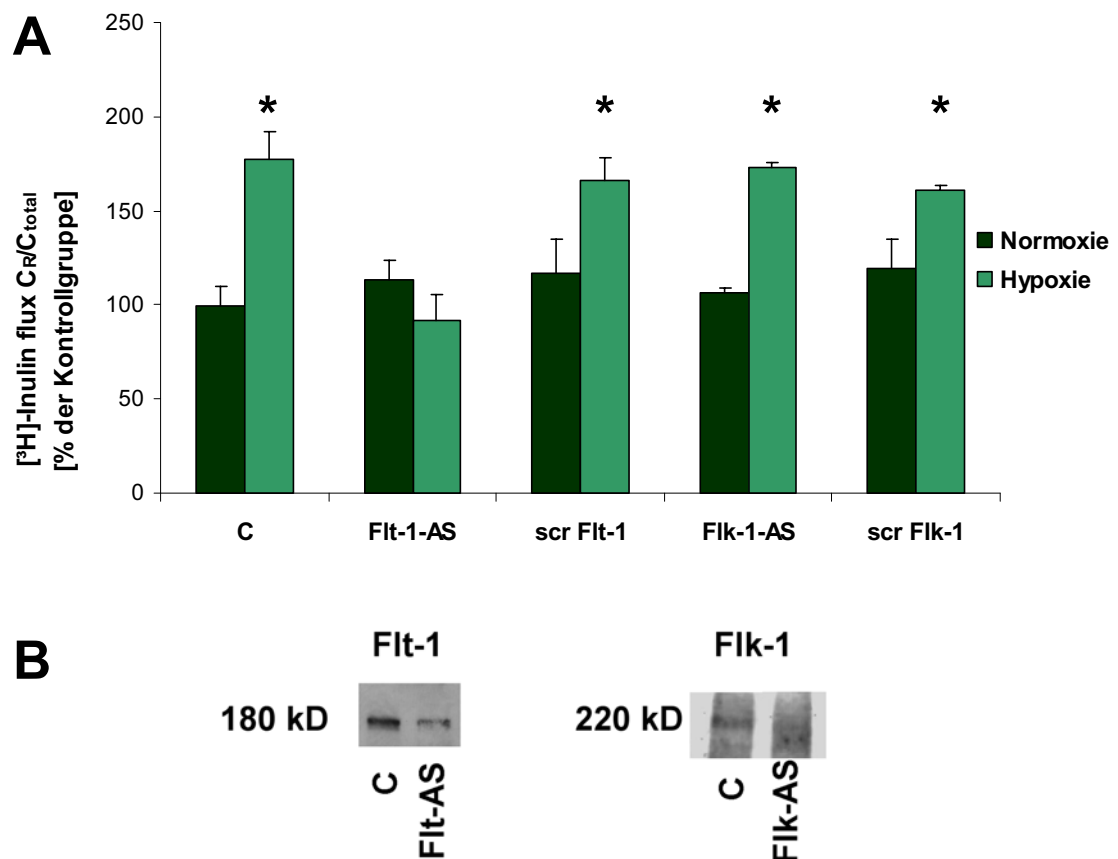


Abbildung 16: Antisense-Oligonukleotide gegen Flt-1 verhindern die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität an BMEC.

A: BMEC-Monolayer wurden für 48h mit den verschiedenen Antisense-Oligonukleotiden kultiviert. Es wurden dabei Antisense-Oligonukleotide gegen Flt-1 (Flt-1-AS) und Flk-1 (Flk-1-AS) sowie Nonsense-Oligonukleotide für beide Rezeptoren (scr Flt-1, scr Flk-1) in einer Konzentration von 2µmol/l verwendet. Dann erfolgte die Inkubation für 3h unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen (Normoxie, keine Zugabe von Agenzien) wurden auf 100 % gesetzt (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; n=24, *p<0,05 bezüglich der Kontrollgruppe).

B: Western Blot Analyse von Flt-1 und Flk-1 in BMEC nach 48 stündiger Kultivierung in An- und Abwesenheit der Antisense-Oligonukleotide gegen Flt-1 und Flk-1.

Die Ergebnisse belegten, dass die Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität an den BMEC tatsächlich durch eine Aktivierung von Flt-1 vermittelt wird. Die alleinige Aktivierung von Flk-1 durch VEGF-E bewirkte hingegen keine Veränderung der Permeabilität. Auch die Hemmung der Expression von Flk-1 durch spezifische AS-Oligonukleotide war nicht imstande, die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität zu verhindern.

Nach Autiero et al.¹⁶⁷ besteht zwischen den VEGF-Rezeptoren ein intermolekularer cross-talk. Hiernach kann die Aktivierung des einen Rezeptors durch einen spezifischen

Liganden auch zur Aktivierung des anderen Rezeptors führen. Es bleibt daher unklar, ob in der Signaltransduktion der Hypoxie- und VEGF-induzierten Hyperpermeabilität neben der Aktivierung von Flt-1 auch die Anwesenheit von Flk-1 erforderlich ist.

Um dies zu untersuchen waren Zellen erforderlich, die erstens in Form eines Zellmonolayers mit hohen Widerstandswerten unter Ausbildung von Tight Junctions wuchsen und zweitens nur Flt-1 exprimierten.

Primäre mikrovaskuläre Endothelzellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen stets beide Rezeptoren. Die bestehenden gentechnisch veränderten Endothelzelllinien, die nur einen der beiden VEGF Rezeptoren exprimieren, sind aufgrund der niedrigen transendothelialen Widerstandswerte für Permeabilitätsstudien ungeeignet und somit auch nur schlecht mit unveränderten Primärzellkulturen wie BMEC vergleichbar⁵⁷.

Es ist bekannt, dass die VEGF-Rezeptoren nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf verschiedenen Epithelzellen exprimiert werden. Dabei wurde bei einigen Epithelzellen jedoch nur ein Rezeptor nachgewiesen^{134,135}. Primäre Epithelzellen, aber auch Epithelzelllinien bilden wie Endothelzellen Tight Junctions und somit Monolayer mit hohen transepithelialen Widerstandswerten aus. Aus diesen Gründen wurden für die Untersuchungen der Rezeptorabhängigkeit der Hypoxie- und VEGF-induzierten Hyperpermeabilität Epithelzellen verwendet. Zunächst wurden verschiedene Epithelzelllinien bezüglich der Expression der beiden VEGF-Rezeptoren untersucht. Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität dieser Zell Linien wurden mit primären Epithelzell-Kulturen verglichen, wozu Choroid-Plexus-Epithelzellen (CPE) isoliert wurden, von denen bisher die Expression von Flk-1 bekannt war²¹⁷. Des Weiteren war bekannt, dass CPE-Zellen VEGF exprimieren⁴⁰. Der Nachweis der Rezeptoren sollte dabei auf molekularbiologischer Ebene (Nachweis der mRNA) durch RT-PCR, Sequenzierung und Northern Blot Analyse, sowie auf Proteinchemischer Ebene (Nachweis der entsprechenden Proteine) durch Western Blot und immunzytochemischer Färbung erfolgen.

3.2 Charakterisierung der CPE-Zellen

Da es sich bei den CPE-Zellen um Primärkulturen handelte, sollte nach der Isolierung zunächst eine morphologische Charakterisierung der Zellen vorgenommen werden. Mittels immunzytochemischer Anfärbung wurden die Zellen dann hinsichtlich des Vorhandenseins von Desmoplakin, α -smooth-muscle-actin und PECAM untersucht.

Morphologie

Die isolierten Choroid-Plexus-Epithelzellen wiesen das typische kopfsteinpflasterartige Aussehen auf. Nach 8 – 10 tägiger Kultivierung bildeten sie einen konfluenten Monolayer, d.h. sie wuchsen nicht mehrschichtig übereinander (Abb. 17 A)

Desmoplakin

Epithelzellen zeichnen sich durch eine feste interzelluläre Verknüpfung aus. Diese Zell-Zell-Verbindung wird unter anderem durch Desmosomen hergestellt. Desmoplakin ist ein obligater Bestandteil von funktionalen Desmosomen, welches die transmembranösen Filamente mit dem desmosomalem Plaque verbinden. Das N-Terminus ist erforderlich für die Lokalisation am Desmosom und interagiert mit der N-terminalen Region von Plakophilin 1 und Plakoglobin. Das C-Terminus stellt die Verbindung mit den transmembranösen Filamenten her²¹⁸. Desmoplakin lässt sich daher als Marker für Epithelzellen verwenden (Abb. 17 B).

α -smooth-muscle-actin

Das Protein α -smooth-muscle-actin findet sich in den Aktin-Filamenten glatter Muskelzellen und Perizyten. Epithelzellen exprimieren dieses Protein nicht. Es eignet sich daher als Negativkontrolle für Epithelzellkulturen und es kann so der Grad der Verunreinigung mit glatten Muskelzellen oder Perizyten bestimmt werden.

Das fluoreszenzmikroskopische Bild zeigt, dass nur ein geringer Anteil der CPE-Kultur α -smooth-muscle-actin positiv ist. Durch die Kernfärbung mit DAPI lässt sich dieser Anteil auf unter 5 % schätzen. Die nötige Reinheit der CPE-Kultur bezüglich glatter Muskelzellen war also gegeben (Abb. 17 C).

PECAM-1

Das Zelloberflächenprotein Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1, CD31) gehört der Immunglobulin-Superfamily mit adhäsiven Eigenschaften an. Es handelt sich um ein einsträngiges Glykoprotein, welches integraler Bestandteil der Zellmembranen von Endothelzellen ist²¹⁹.

PECAM-1 kommt auf Zellen vor, die mit dem Gefäßsystem in Verbindung stehen. Es ist auf vaskulären Endothelzellen mit einer Dichte von bis zu einer Million Molekülen pro Zelle sehr stark ausgeprägt. Da Epithelzellen kein PECAM exprimieren, lässt es sich als Marker für eine Verunreinigung der Zellkultur mit Endothelzellen verwenden. Wie in Abbildung 17 D ersichtlich, ist in der CPE-Zellkultur keine Anfärbung von Zellmembranen zu erkennen, eine Verunreinigung der Kultur durch Endothelzellen ist damit ausgeschlossen.

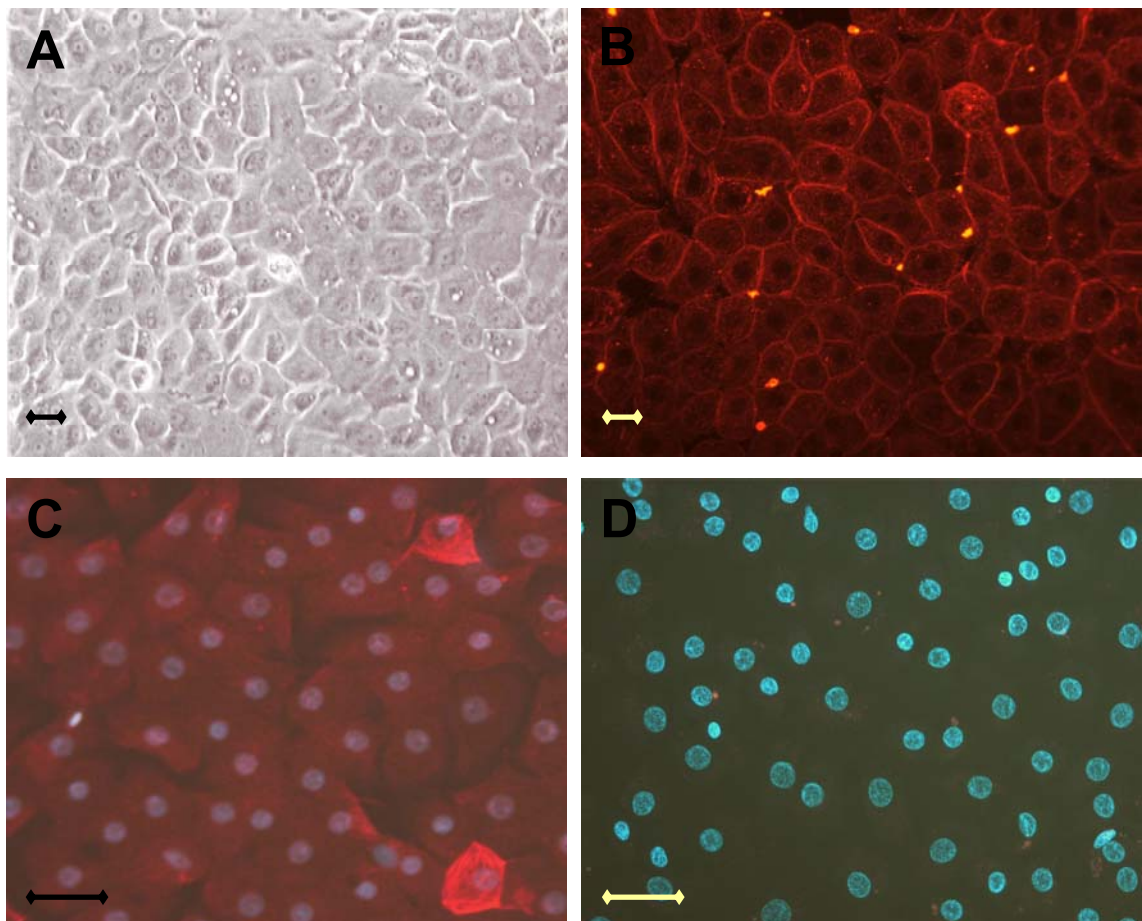


Abbildung 17: Charakterisierung der Choroid Plexus Epithelzellen.

A: Morphologie der CPE. Nativ-Fotodokumentation nach 8-tägiger Kultivierung.

Immunzytochemische Anfärbung der CPE-Zellen mit einem Erst-Antikörper gegen Desmoplakin (B), „α-smooth muscle Aktin“ (C) und PECAM-1 (D). Die Zweit-Antikörper waren Cy³-konjugiert. Die Zellen wurden auf Laminin-beschichteten 8-Kammer-Objektträgern ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Danach folgte die immunzytochemische Anfärbung wie in Kapitel 2.10 beschrieben. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Balken entspricht 50 µm.

3.3 Nachweis der VEGF-Rezeptoren in Epithelzellen

3.3.1 mRNA Expression der VEGF-Rezeptoren in Epithelzellen

3.3.1.1 Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit der Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sollte gezeigt werden, welche Epithelzellarten mRNA für die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 (Flt-1 und Flk-1) exprimieren.

RNA-Proben von CSG, CPE, MDCK und BMEC wurden auf das Vorhandensein von mRNA, die für die VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 kodieren, untersucht. Für die Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne RNA bereitet. Die RT-PCR und die anschließende Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben durchgeführt.

Die Amplifikationsprodukte der RT-PCR mit Primern für den Flt-1 sollten bei 470 Basenpaaren (bp) liegen, die Amplifikationsprodukte mit Primer für den Flk-1 bei 410 Basenpaaren (bp).

Nach Amplifikation mit Primern für Flt-1 zeigten die Proben von CPE, CSG und BMEC eine Bande in der entsprechenden Höhe (470 bp). Sie exprimierten folglich mRNA für Flt-1. Mit den Primern für Flk-1 zeigten sich lediglich bei CPE und BMEC Banden in der entsprechenden Höhe (410 bp). Die Proben der MDCK zeigten bei keiner Amplifikation eine Bande, sie exprimierten weder Flt-1 noch Flk-1 mRNA. Auch die Negativkontrolle (ohne mRNA) zeigte keine Bande; eine mögliche Kontamination mit Fremd-RNA konnte somit ausgeschlossen werden (Abbildung 18).

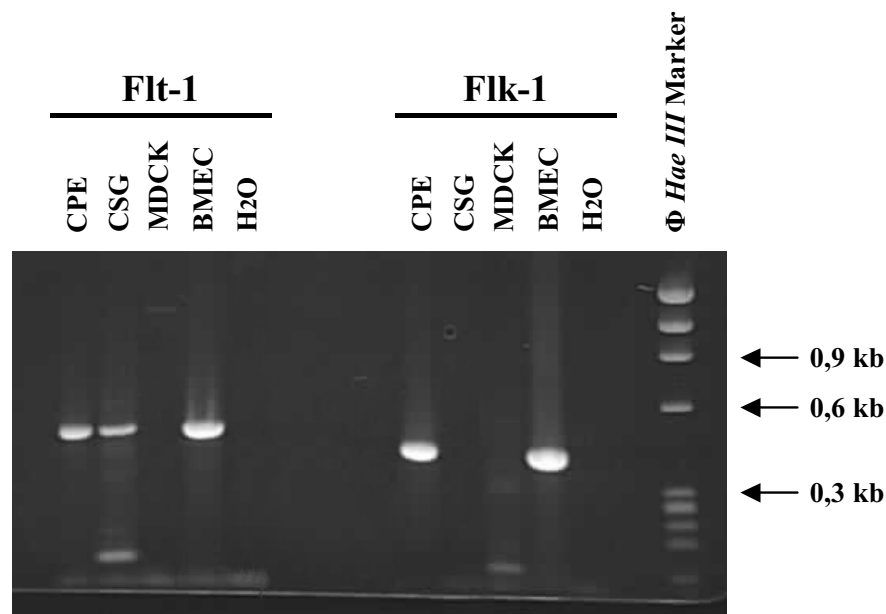


Abbildung 18: RT-PCR mit mRNA-Proben von CPE, CSG, MDCK und BMEC sowie einer Negativkontrolle (ohne mRNA). Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für die VEGF-Rezeptoren 1 (Flt-1) und 2 (Flk-1) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch getrennt. Das Gel ist dann mit dem Gene Genius BioImaging System dokumentiert worden.

3.3.1.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um zu kontrollieren, ob die Amplifikationsprodukte der RT-PCR auch tatsächlich den VEGF Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 entsprachen, wurde eine Sequenzierung nach der Methode von Sanger durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden dazu zunächst in Plasmide einkloniert und diese dann in kompetente Bakterien transformiert. Nach ausreichendem Wachstum der Bakterienklone erfolgte die Plasmidpräparation (Kapitel 2.8.5-12).

Die Sequenzierung der Amplifikationsprodukte, zu deren Herstellung die Primer für VEGF Rezeptor 1 verwendet wurden, ergab folgende Basensequenz:

```

1   5'- GGCCC GACGT CGCAT GCTCC CGVCC GCCAT GGCGG CGCCG GGAAT TCGAT
51   TCTGC CACTC TCATT GTAAA CGTGA AGCCT CAGAT CTACG AAAAG TCCGT
101  GTCCT CGCTT CCAAG CCCAC CTCTC TATCC GCTGG GCAGC AGACA AGTCC
151  TCACT TGCAC CGTGT ATGGC ATCCC TCGGC CAACA ATCAC GTGGC TCTGG
201  CGCCC CTGTC ACCAC AATCA CTCCA AAGAA AGGTA TGA CTCTG ACTGA
251  GAATG AAGAA TCCTT TATCC TGGAT CCCAG CAGCA ACTTA GGAAA CAGAA
301  TTGAG AGCAT CTCTC AGCGC ATGAC GGTCA TAGAA GGAAC AAATA AGACG
351  GTTAG CACAT TGGTG GTGGC TGA CTYAG ACCCC TKGAA TCTAC AGCTG
401  CCGGG CCTTC AATAA AATAG GGACT GTGGA AAGAA ACATA AAATT TTATG
451  TCACA GATGT GCCGA ATGGC TTTCA CGTTT CCTTC CAAAA GATGC CAGCC
501  GAAGG AGAGG ACCTG AAAC TCA TCACT AGTCA ATTCG CGGCC GCCTG
551  CAG -3'

```

Die Basen 52 – 72 sowie die Basen 504 – 523 (grau hinterlegt) entsprechen den Basen der verwendeten Primer Flt-1 forward und Flt-1 reverse. Vor dem forward-Primer und hinter dem reverse-Primer befinden sich die Basensequenzen des pGEM[®]-T Easy Vektors, die von den Restriktionsenzymen spezifisch erkannt werden. Zwischen den Primern (Basen 52 – 523) liegt der Amplifikationsbereich. Sequenzvergleiche mittels der Datenbanken von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ergaben eine Homologie zur Maus mRNA für Flt-1 von 98% im Bereich der Basen 1513-1984 (NM_010228.3, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Homologien zu anderen RNA's wurden nicht gefunden.

Die Sequenzierung der Amplifikationsprodukte mit den Primer für VEGF Rezeptor 2 ergab folgende Basensequenz:

```

1   5'- TAATA CGACT CACTA TAGDN NGAAT TGGGC CCGAC GTCGC ATGCT CCCGG
51   CCGCC ATGGC GGCGC CGGGA ATTCG ATTGT TTGCA AGAAC TTGGA TGCTC
101  TTTGG AAAAT GAATG CTACC ATGGT CTCTA ATAGC ACGAA TGACA TTTTG
151  ATCAT GGAAC TGCAG AATGC ATCCT TGCAG GACCA AGGAG ACTAC GTCTG
201  CTTTG CTCAG GACAG GAAGA CCAAG AAAAG ACATT GCGTG GCCAG GCAGC
251  TCACA GTCCT AGAGC GCATG GCACC CGCGA TCACA GGAAA CCTCG AGAAT
301  CAGAC GACAA GTATT GGTGA AACCA TTGAA GTTTC CTGCA CAGCA TCTGG
351  GAATC CTTCT CCACA GATTA CATGG TTAA AGATA ATGAG ACACT CGTGG
401  AAGAC TCAGG CATCG TGCTA AAAGA TGGGA ACCGG AACCT TACTA TCCGC
451  AGGGT GAGGA AGGVG GATGA AGGCC TCTAC ACCTG CCAGG AATCA CTAGT
501  GAATT CGCGG CCGCC TGCAG GTCGA CCATA TGGGA GAG -3'

```

Die Basen 79 – 99 sowie 472 – 490 (grau hinterlegt) entsprechen wiederum den Basen der verwendeten Primer Flk-1 forward und Flk-1 reverse. Zwischen den Primern (Basen 79 – 490) liegt der Amplifikationsbereich. Der Sequenzvergleich ergab hier eine Homologie zur Maus mRNA für Flk-1 von 85% im Bereich der Basen 2058-2469 (NM_010612.2, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Auch hier wurde keine Homologie zu anderen RNA's gefunden.

Zusammenfassend ergaben die Sequenzanalyse und der anschließende Sequenzvergleich, dass es sich bei den Amplifikationsprodukten der RT-PCR tatsächlich um die VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 handelt. Ein falsch positives Ergebnis der RT-PCR aufgrund eines falschen Primerdesignes konnte damit ausgeschlossen werden. Ferner zeigte der Sequenzvergleich eine ausreichend hohe Homologie der Amplifikationsprodukte für die nachfolgende Northern Blot Hybridisierung. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die ³²P-markierten Sonden spezifisch an die mRNA von Flt-1 bzw. Flk-1 binden.

3.3.1.3 Northern Blot

Um die Ergebnisse der RT-PCR zu bestätigen, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Die Durchführung erfolgte dabei wie unter 2.8.13 beschrieben.

Wie bei der RT-PCR wurden die BMEC als Positivkontrolle eingesetzt, da bei Endothelzellen das Vorhandensein von RNA für beide Rezeptoren bekannt ist.

Im Falle der Hybridisierung mit der ^{32}P -markierten Flt-1 Sonde erkannte man eine schwarze Bande bei den Proben von BMEC, CSG und CPE. Diese Zellen exprimierten also spezifische Flt-1 mRNA. Bei der MDCK-Probe war keine Bande erkennbar.

Durch Hybridisierung mit der ^{32}P -markierten Flk-1 Sonde gelang der Nachweis der mRNA-Expression bei BMEC und CPE. CSG und MDCK bildeten keine mRNA, welche für den Flk-1 Rezeptor kodiert (Abbildung 19).

Der Nachweis von β -actin mRNA war in allen Proben positiv, eine fehlerhafte mRNA-Isolierung oder Gelelektrophorese war damit ausgeschlossen.

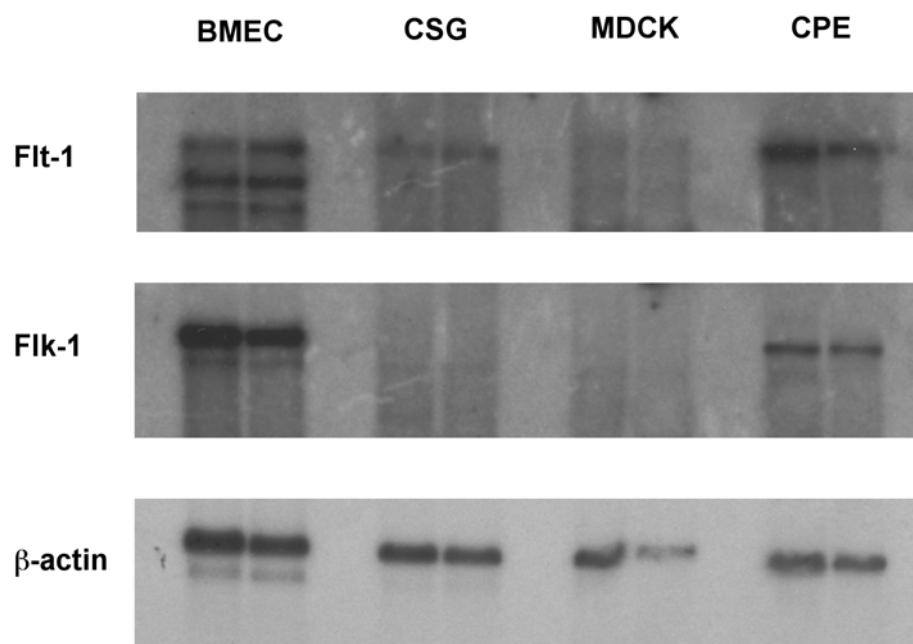


Abbildung 19: Northern Blot Analyse mit mRNA-Proben von BMEC, CSG, MDCK und CPE. Die mRNA wurde mit Hilfe der Dynabeads® Oligo(dT)25 isoliert und anschließend in einem 1 %igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Als Sonden wurden die Amplifikationsprodukte der RT-PCR mit Primern für den VEGF-Rezeptor 1 (Flt-1) und VEGF-Rezeptor 2 (Flk-1) benutzt. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Sonde für β -actin verwendet.

Zusammenfassend ließ sich aus den Ergebnissen der RT-PCR und Northern Blot Analysen demnach zeigen, dass CPE-Zellen mRNA für beide VEGF-Rezeptoren, CSG-Zellen lediglich für Flt-1 und MDCK-Zellen für keinen der Rezeptoren exprimierten.

3.3.2 Proteinexpression der VEGF-Rezeptoren in Epithelzellen

3.3.2.1 Western Blot

Nachdem mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die mRNA Expression der beiden VEGF-Rezeptoren in Epithelzellen untersucht worden war, sollte im Folgenden die Expression der VEGF-Rezeptoren auch auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.9 beschrieben.

Abbildung 20 zeigt das Ergebnis des Western Blot mit Proben von CPE, CSG, MDCK und BMEC nach Inkubation mit einem Antikörper gegen Flt-1. Der Antikörper Flt-1 (C-17) ist gegen das Carboxy-Ende des Proteins gerichtet und zeigt keine Kreuzreaktivität mit Flk-1, Flt-4 oder anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen.

Der Nachweis war positiv bei den Proben von CPE, CSG und BMEC. Bei den Proben von MDCK war keine Bande erkennbar und der Rezeptor-Nachweis damit negativ.

Bei den gleichen Proben sollte dann auch der Nachweis von Flk-1 erfolgen. Die Membranen wurden dazu zunächst wie in Kapitel 2.9.7 gestrippt und anschließend mit einem Antikörper gegen Flk-1 (C-1158) inkubiert. Dieser Antikörper ist gegen die Aminosäuren 1158 – 1345 am Carboxy-Ende des Proteins gerichtet.

Bei CPE und BMEC konnte Flk-1 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Proben von CSG und MDCK zeigten keine Banden; der Nachweis fiel damit negativ aus.

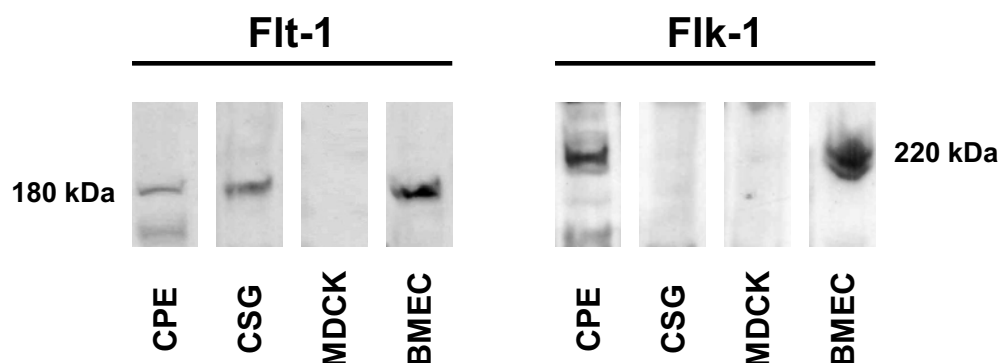


Abbildung 20: Western Blot Analyse der Expression von Flt-1 und Flk-1 in CPE, CSG, MDCK und BMEC. Die Zellen wurden gewaschen und mit 1 ml Lysispuffer lysiert. 25 µg Gesamt-Protein wurden dann im 6 % Tris/Glycin Fertiggel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Nachweis der VEGF-Rezeptoren erfolgte mit den Antikörpern gegen Flt-1 (C-17) oder Flk-1 (C-1158).

3.3.2.2 Immunzytochemische Färbung

Die Immunzytochemische Färbung wurde wie in Kapitel 2.10 beschrieben durchgeführt. Als Erst-Antikörper wurden die gleichen Antikörper wie beim Western Blot verwendet. Wiederum dienten die BMEC als Positivkontrolle.

Es zeigte sich dabei ein positiver Nachweis von Flt-1 bei BMEC, CSG und CPE. Bei der Behandlung mit dem Antikörper gegen Flk-1 zeigte sich ein positiver Nachweis bei BMEC und CPE. Bei CSG war keine Anfärbung und somit keine Expression von Flk-1 erkennbar (Abbildung 21 und 22).

Bei allen Versuchen wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt, bei der die Kultur ohne Inkubation mit dem Erstantikörper direkt mit dem Zweitantikörper behandelt wurde. So konnten möglicherweise Vorliegende Reaktionen des Zweitantikörpers mit Antigenen der Zellkulturen, welche zu falsch positiven Ergebnissen geführt hätten, ausgeschlossen werden.

Eine Auflistung der verwendeten Antikörper sowie der eingesetzten Konzentrationen findet sich im Anhang dieser Arbeit in Kapitel 8.1.6.

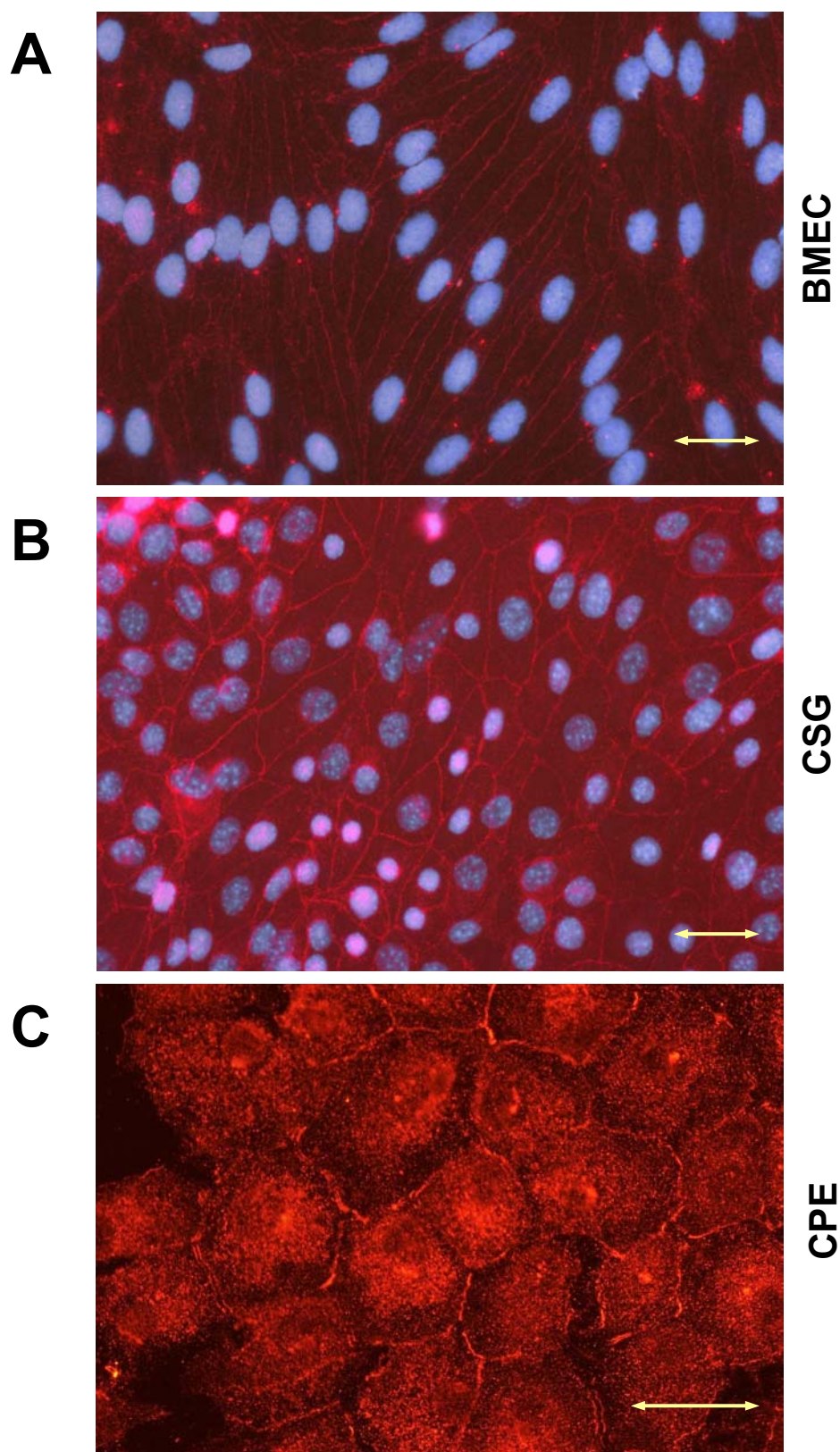


Abbildung 21: Immunzytochemischer Nachweis von Flt-1 in BMEC (A), CSG (B) und CPE (C) mit einem gegen Flt-1 gerichteten polyklonalem Antikörper. Als Zweit-Antikörper wurde goat anti-rabbit Ig, Cy³-konjugiert verwendet. Die Zellen wurden auf 8-Kammer-Objektträgern ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Danach folgte die immunzytochemische Anfärbung wie in Kapitel 2.10 beschrieben. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Balken entspricht 50 µm.

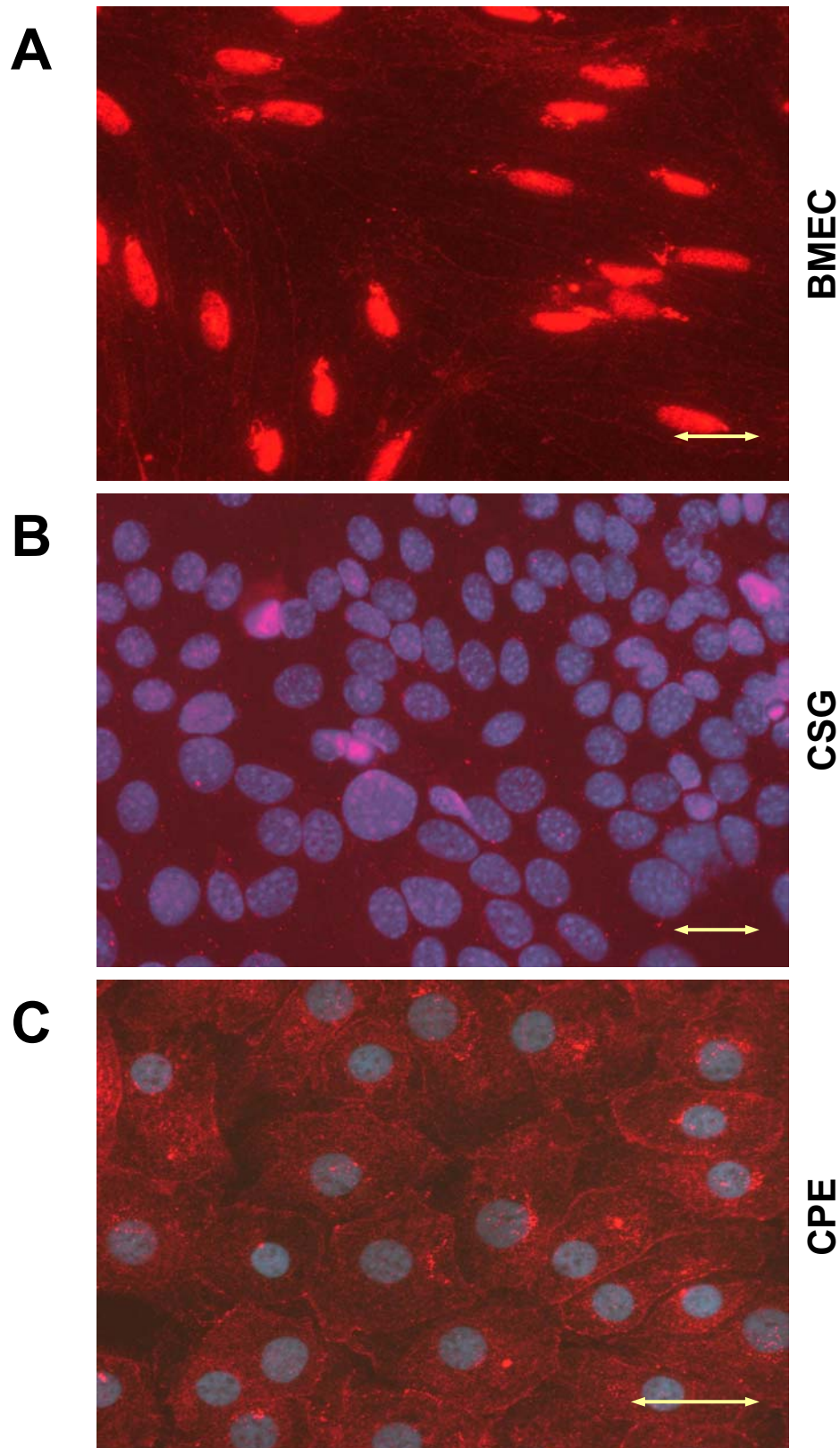


Abbildung 22: Immunzytochemische Anfärbung von BMEC (A), CSG (B) und CPE (C) mit einem gegen Flk-1 gerichteten polyklonalem Antikörper. Als Zweit-Antikörper wurde goat anti-rabbit Ig, Cy³-konjugiert verwendet. Die Zellen wurden auf 8-Kammer-Objektträgern ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Danach folgte die immunzytochemische Anfärbung wie in Kapitel 2.10 beschrieben. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Balken entspricht 50 µm.

Zusammenfassend ließ sich aus den Ergebnissen von RT-PCR, Northern Blot, Western Blot sowie der Immunzytochemie folgendes über die Expression der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 in den verschiedenen Epithelzellarten ableiten:

- Die BMEC erbrachten als Positivkontrolle sowohl beim Rezeptor 1 als auch beim Rezeptor 2 einen positiven Nachweis beider Rezeptoren.
- CPE-Zellen synthetisierten mRNA und Protein beider VEGF-Rezeptoren (Flt-1 und Flk-1).
- In den CSG-Zellen wurde lediglich Flt-1 exprimiert. Es konnte weder mRNA noch Protein von Flk-1 nachgewiesen werden.
- MDCK besaßen weder für Flt-1 noch für Flk-1 eine entsprechende mRNA. Auch das Protein konnte nicht nachgewiesen werden.

Proben	Flt-1	Flk-1
CPE	+	+
CSG	+	-
MDCK	-	-
BMEC	+	+

+ Rezeptor vorhanden

- Rezeptor nicht vorhanden

Tabelle 2: Überblick über die Ergebnisse von RT-PCR, Northern Blot Analyse, Western Blot Analyse und Immunzytochemie.

3.4 Widerstandswerte der verwendeten Epithelzellen

Epithelzellen wachsen *in vitro* als sogenannte Monolayer. Sie bilden dabei wie auch *in vivo* interzelluläre Verbindungen aus. Dazu gehören die Adherens Junctions und Tight Junctions. Die Tight Junctions bilden letztlich die Permeabilitätsbarriere des parazellulären Transportes über den Monolayer und sind somit verantwortlich für den messbaren transepithelialen elektrischen Widerstand. Um eine Aussage über die Qualität der Epithelzellmonolayer und der Tight Junctions auf den Filtern machen zu können, wurden daher neben der optischen Kontrolle ab dem dritten Tag der Kultivierung Widerstandsmessungen durchgeführt. Mit Hilfe von zwei Elektroden, die zeitgleich einmal in den Filter (apikale Seite) und in das diesen umgebene Medium (basolaterale Seite) eingetaucht wurden, konnte so die Ionenpermeabilität über den Epithelzellmonolayer bestimmt werden.

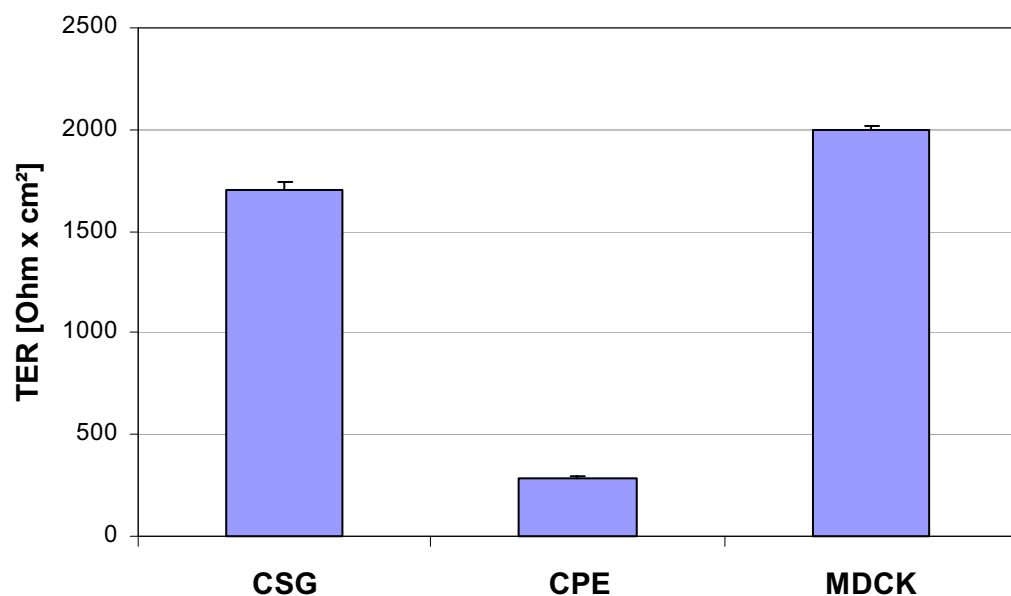


Abbildung 23: Maximale Widerstandswerte (transepithelial electric resistance (TER)) der verschiedenen Epithelzellmonolayer auf Transwell® Polyester und Polycarbonate Membranen. Die Zellen wurden ausgesät und für vier bis sieben Tage bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Werte geben die Mittelwerte der gemessenen Widerstände \pm SEM an. (n=20)

Die Primärkulturen der Choroid Plexus Epithelzellen erreichten nach 7 Tagen einen Widerstandswert von bis zu 290 Ωcm^2 . Die Widerstände der CSG und MDCK lagen wesentlich höher. So konnten nach 7 Tagen Werte von 1690 Ωcm^2 für CSG und 2000 Ωcm^2 für MDCK gemessen werden (Abbildung 23).

Für die folgenden Permeabilitätsversuche wurden nur Filter mit einem Widerstand von mehr als 200 Ωcm^2 (CPE) bzw. 500 Ωcm^2 (CSG und MDCK) eingesetzt.

3.5 Mechanismus der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität

Aus den vorangegangenen Versuchen an den mikrovaskulären Gehirndothelzellen (BMEC) wurde erkennbar, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität via VEGF durch eine Aktivierung von Flt-1 vermittelt wird. Die folgenden Versuche sollten nun zeigen, ob für die Hypoxie- und VEGF-induzierten Permeabilitätsveränderungen auch die Expression von Flk-1 notwendig ist. Dazu wurden die Epithelzellen CPE, CSG und MDCK, die hinsichtlich der Expression der VEGF-Rezeptoren untersucht worden waren und bei denen die Ausbildung von Tight Junctions nachgewiesen werden konnte, verwendet. Zunächst sollte gezeigt werden, ob auch bei den Epithelzellen die Hypoxie-induzierte Permeabilitätsänderungen über VEGF und Aktivierung von Flt-1 erfolgen.

3.5.1 Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität an Epithelzellen

Wie in Abbildung 24 ersichtlich, war die Permeabilität von CSG und CPE unter hypoxischen Bedingungen signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe, die unter normoxischen Bedingungen im Brutschrank verblieb. Bei den MDCK-Zellen, die keinen der beiden VEGF-Rezeptoren exprimieren, konnte keine Hyperpermeabilität unter hypoxischen Bedingungen festgestellt werden.

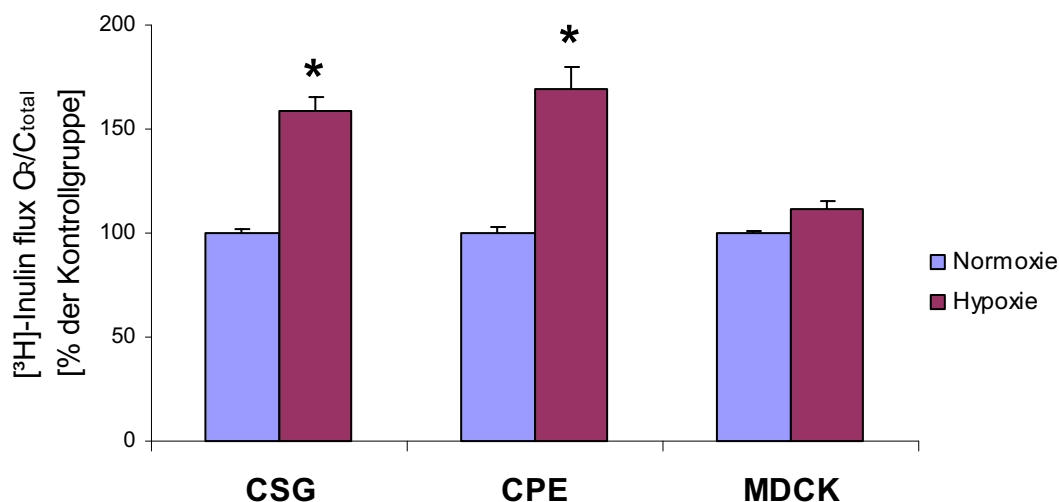


Abbildung 24: Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität von CSG, CPE und MDCK gegenüber $[^3\text{H}]$ -Inulin. Die Zellen wurden auf Transwellfilter ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Dann erfolgte die 24 stündige Behandlung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt als Quotient aus der im äußeren Kompartiment bestimmten Inulinkonzentration und der Konzentration, die zu Versuchsbeginn der apikalen Kammer zugegeben wurde (C_R/C_{total}). Die Mittelwerte der Kontrollgruppen (Normoxie) wurden auf 100 % gesetzt (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=24$, $*p<0,05$ bezüglich der Kontrollgruppe).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Monolayer von CSG und CPE auf hypoxische Bedingungen mit einem Anstieg der Permeabilität reagieren, sollte nun geprüft werden, ob die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität durch VEGF vermittelt wird, wie es für Endothelzellen schon nachgewiesen werden konnte.

Dazu wurde dem Medium ein neutralisierender Antikörper gegen VEGF (antiVEGF) sowie sFlt, ein VEGF-Rezeptor in gelöster Form, zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen 24 h unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert.

Sowohl bei den CSG-Monolayern, als auch bei den CPE-Monolayern konnte die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität durch die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF sowie durch sFlt annähernd vollständig aufgehoben werden. Die Gruppe, die mit den Hemmstoffen unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurde, zeigte keine Veränderung der Permeabilität gegenüber der Kontrollgruppe. (Abbildung 25)

Die Hypoxie-induzierten Permeabilitätsveränderungen werden somit auch in Epithelzellen durch das unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimierte VEGF in autokriner Weise bewirkt.

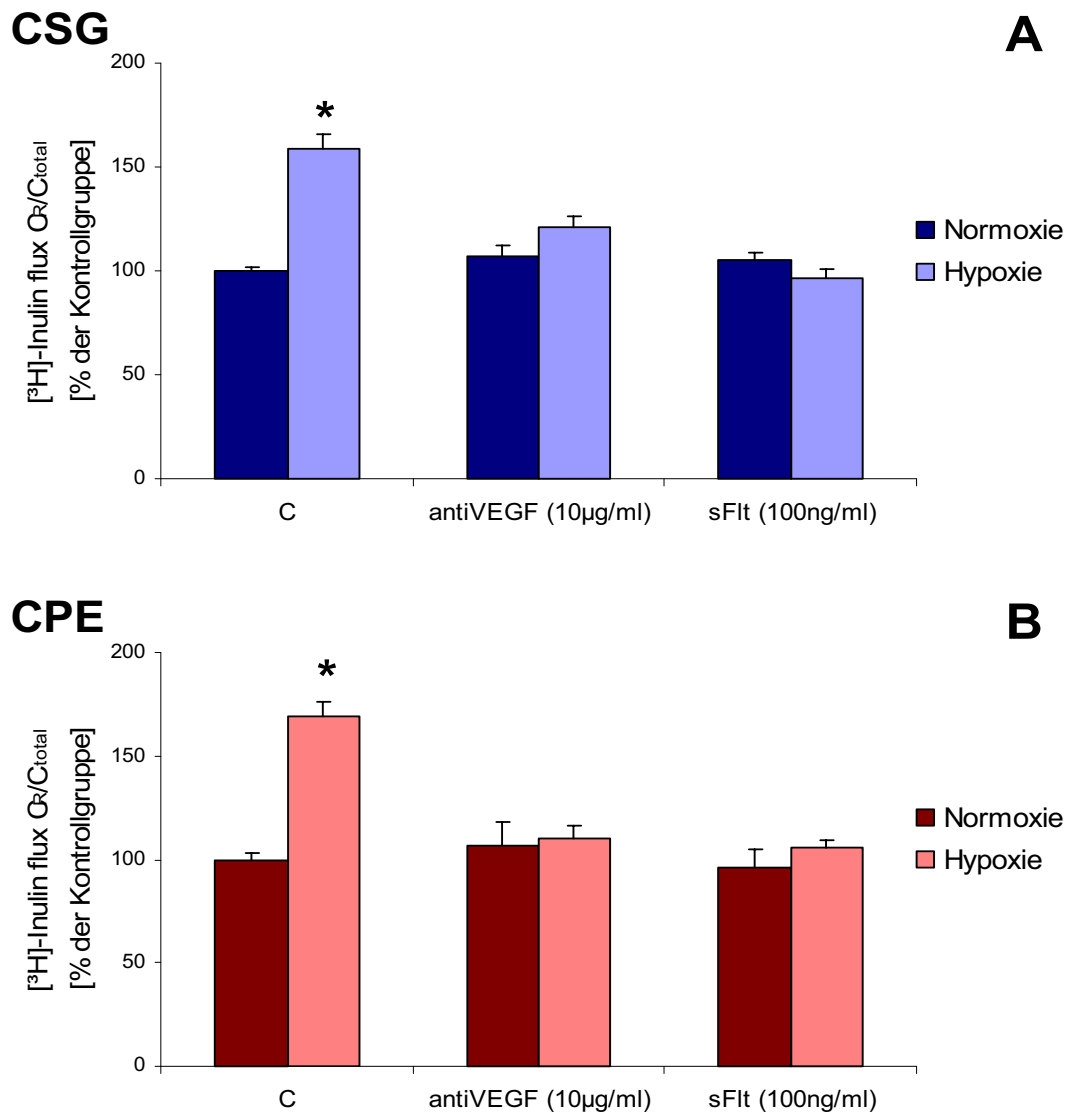


Abbildung 25: VEGF ist der Mediator der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität. Messung der Permeabilität der Zellmonolayer von CSG [A] und CPE [B] gegenüber $[^3\text{H}]$ -Inulin bei 24 stündiger Behandlung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und Zugabe von anti-VEGF (10 µg/ml) und sFlt (100ng/ml). Die Kontrollgruppe (C) verblieb ohne Zusatz im Brutschrank. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen wurden auf 100 % gesetzt (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=24$, $*p<0,05$ bezüglich der Kontrollgruppe).

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden Versuche mit AS-Oligonukleotiden gegen die VEGF-Rezeptoren an den CSG-Zellen durchgeführt. Erwartungsgemäß konnte lediglich die Zugabe der AS-Oligonukleotide gegen Flt-1 die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität verhindern, wohingegen die AS-Oligonukleotide gegen Flk-1 sowie die Nonsense-Oligonukleotide (scr) zu keiner Veränderung der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität führten (Abbildung 26).

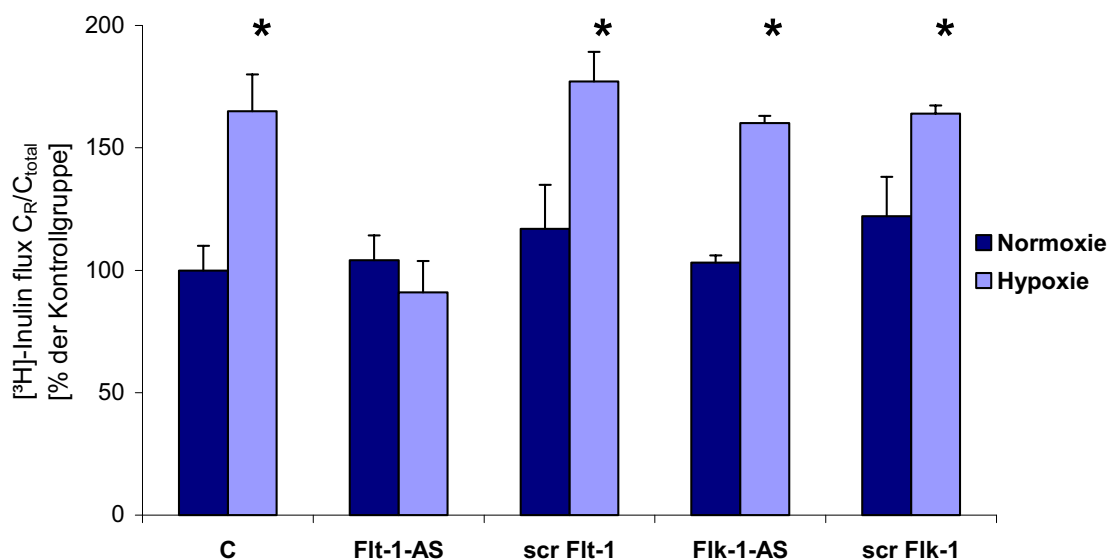


Abbildung 26: Antisense-Oligonukleotide gegen Flt-1 verhindern die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität an CSG.

CSG-Monolayer wurden für 48h mit den verschiedenen Antisense-Oligonukleotiden kultiviert. Es wurden dabei Antisense-Oligonukleotide gegen Flt-1 (Flt-1-AS) und Flk-1 (Flk-1-AS) sowie nonsense-Oligonukleotide für beide Rezeptoren (scr Flt-1, scr Flk-1) in einer Konzentration von 2µmol/l verwendet. Dann erfolgte die Inkubation für 24h unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen (Normoxie, keine Zugabe von Agenzien) wurden auf 100 % gesetzt (Die Werte stellen die Mittelwerte ± SEM dar; n=10, *p<0,05 bezüglich der Kontrollgruppe).

3.5.2 VEGF-/ PlGF-induzierte Hyperpermeabilität

Im Weiteren sollte der Einfluss von VEGF und PlGF, das lediglich Flt-1 aktiviert, auf die Permeabilität der Epithelzellmonolayer untersucht werden. Dazu wurde das Medium in apikaler und basolateraler Kammer mit 10ng/ml VEGF bzw. PlGF versetzt. Da Fischer et al.⁷⁸ am *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke zeigen konnten, dass die permeabilitätssteigernde Wirkung von VEGF und PlGF nur in Gegenwart eines Antioxidans erkennbar ist, wurde dem Medium zusätzlich α-Liponsäure (α-LA) in einer Konzentration von 2µM zugegeben.

Die Permeabilität der MDCK-Monolayer veränderte sich erwartungsgemäß weder durch die Zugabe von VEGF und α-LA noch durch Zugabe von PlGF und α-LA signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, da MDCK keinen VEGF-Rezeptor exprimierten. Auch die Zugabe von α-LA alleine hatte keine Änderung der Permeabilität zur Folge.

Sowohl die CSG-Monolayer als auch die CPE-Monolayer zeigten bei Zugabe von VEGF und α-LA einen signifikanten Anstieg der Permeabilität gegenüber der

Kontrollgruppe, ebenso nach Zugabe bei PlGF und α -LA. Die Zugabe von α -LA alleine bewirkte hingegen keinen Anstieg der Permeabilität (Abbildung 27).

Demnach zeigten die Versuche, dass sowohl durch Aktivierung beider Rezeptoren (CPE-Zellen, Zugabe von VEGF) als auch nach alleiniger Aktivierung von Flt-1 (Zugabe von PlGF) die Permeabilität der Monolayer erhöht wurde. Ferner ließ sich dieser Effekt auch in Abwesenheit von Flk-1 beobachten, da die CSG-Zellen Flk-1 nicht exprimierten.

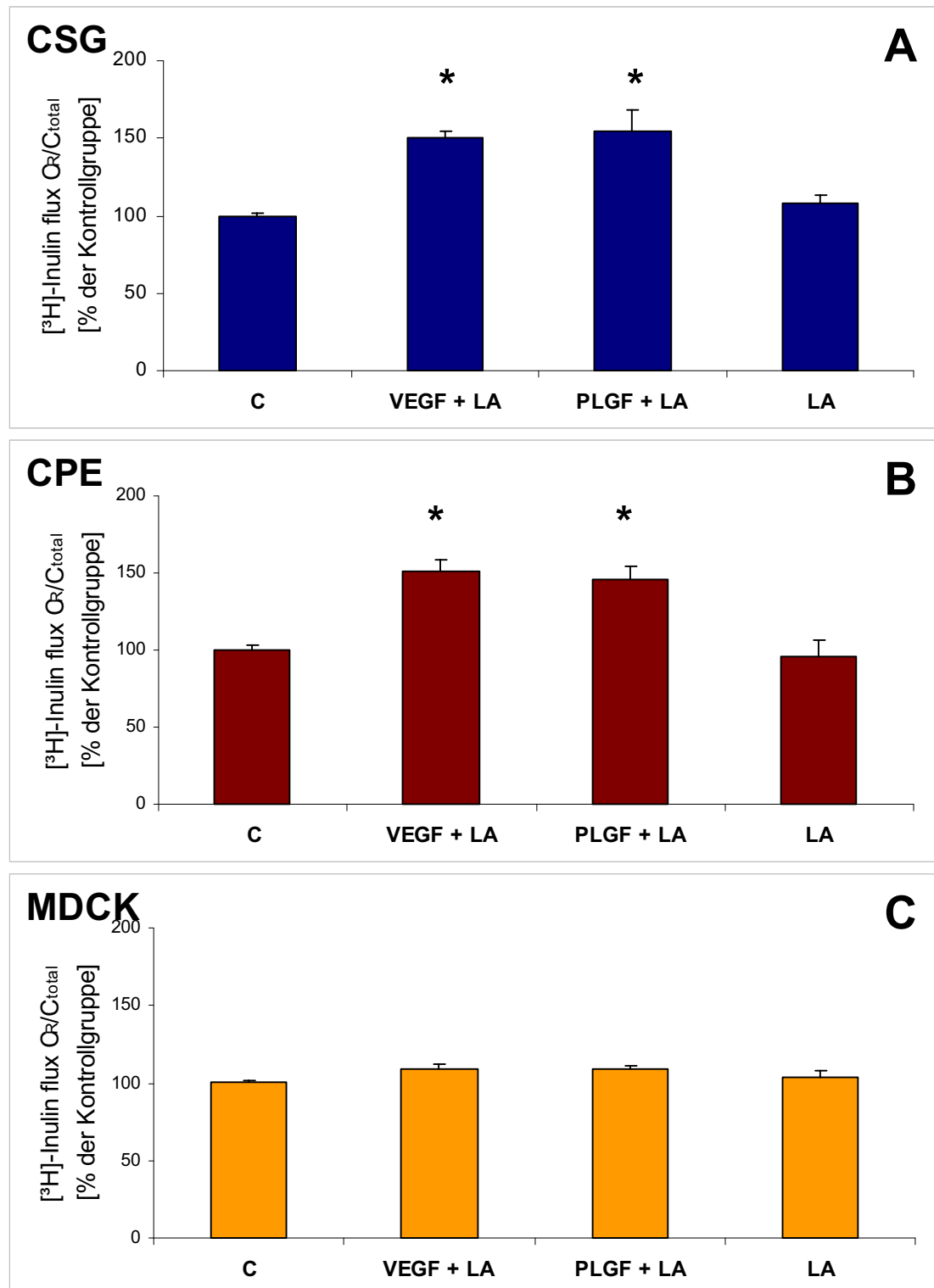


Abbildung 27: Permeabilitätsänderung der Zellmonolayer von CSG [A], CPE [B] und MDCK [C] gegenüber [³H]-Inulin bei 24 stündiger Behandlung unter normoxischen Bedingungen und Zugabe von VEGF (10 ng/ml) und α -LA (2 μ M) bzw. PLGF (10 ng/ml) und α -LA (2 μ M) und α -LA (2 μ M). Der Kontrollgruppe (C) wurden keine Agenzien zugesetzt. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen wurden auf 100 % gesetzt (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; n=12, *p<0,05 bezüglich der Kontrollgruppe).

3.5.3 Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität erfolgt durch Aktivierung des PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweges

In vorangegangenen Studien am *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke konnte für die Signaltransduktion der Hypoxie- und VEGF-induzierten Hyperpermeabilität an BMEC die Aktivierung des PI3-K/Akt Signalweges ausgemacht werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl die Nitroxid-Synthase (NOS) und die lösliche Guanylatzyklase (sGC) als auch die Phospholipase C (PLC) in die Signalvermittlung involviert sind. Die Hyperpermeabilität wurde auch durch PlGF, dass nur Flt-1 aktiviert, bewirkt^{78,119}. Es konnte dabei jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob dazu die Anwesenheit von Flk-1 notwendig ist.

Zur Klärung dieser Frage wurden daher Permeabilitätsmessungen in Normoxie und Hypoxie unter Zugabe verschiedener Hemmstoffe des PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweges an den CSG-Zellen durchgeführt, da diese Zellen, wie oben gezeigt, lediglich Flt-1, aber nicht Flk-1 exprimieren.

Verwendet wurden hierzu folgende Hemmstoffe:

Hemmstoff	→	Inhibition der
• LY294002	→	Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) ²²⁰
• Wortmannin (WM)	→	Phosphoinositid-3-Kinase ²²¹
• U73122	→	Phospholipase C (PLC) ²²²
• BIM	→	Protein Kinase C (PKC) ²²³
• NMMA	→	Nitroxid-Synthase (NOS) ²²⁴
• ODQ	→	Guanylatzyklase (GC) ²²⁵
• SB203580	→	p38 MAPK ²²⁶
• PD98059	→	p42/44 MAPK ²²⁷

Es zeigte sich hierbei, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität des CSG-Monolayers durch die Zugabe von LY294002 sowie von Wortmannin, beides Inhibitoren der PI3-K, aufgehoben werden konnte. Die Zugabe von U73122, einem Hemmstoff der Phospholipase C zeigte keinen Effekt auf die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität. Sowohl durch Inhibition der Nitroxid-Synthase (NOS) durch NMMA als auch durch Inhibition der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch ODQ konnte ebenfalls die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität geblockt werden. Die Zugabe von BIM, was eine Blockade der Proteinkinase C bewirkt, sowie die Zugabe

von SB203580 und PD98059 (Hemmung der MAPK p38 und p42/44) hatte keinen Einfluss auf die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität. Unter normoxischen Bedingungen veränderte keiner der verwendeten Hemmstoffe die Permeabilität signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 28).

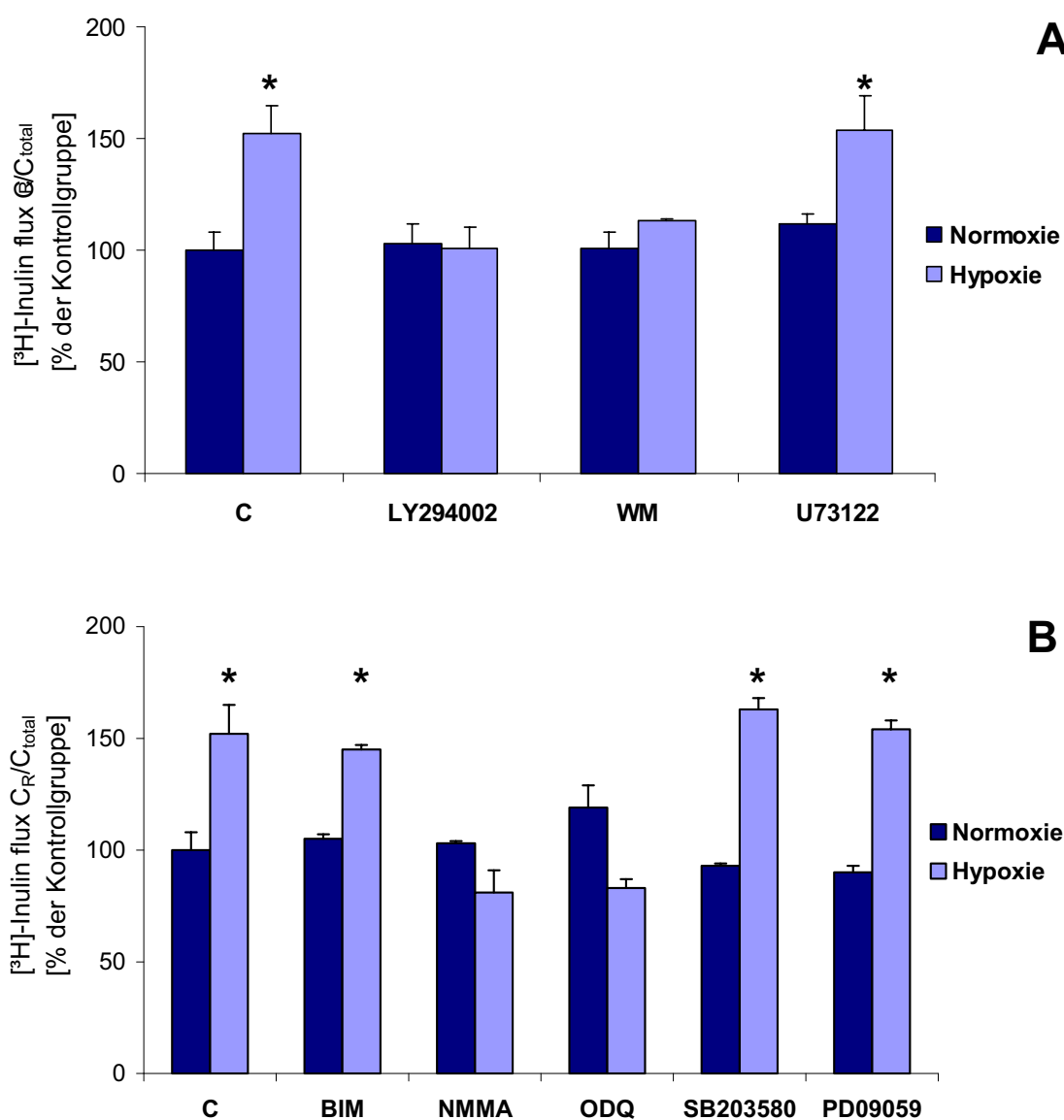


Abbildung 28: Messung der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität des CSG-Monolayers gegenüber $[^3\text{H}]$ -Inulin unter Zugabe verschiedener Inhibitoren der Signaltransduktion.

A: CSG-Monolayer wurden für 24h unter normoxischen (hell) und hypoxischen (dunkel) Bedingungen unter Zugabe von LY294002 (50 μM), WM (100nM) und U73122 (2,5 μM) inkubiert.

B: CSG-Monolayer wurden für 24h unter normoxischen (hell) und hypoxischen (dunkel) Bedingungen unter Zugabe von BIM (2,5 μM), NMMA (50 μM), ODQ (50 μM), SB203580 (10 μM) und PD98059 (20 μM) inkubiert. Der Kontrollgruppe (C) wurden keine Agenzien zugesetzt. Die Mittelwerte der Kontrollgruppen wurden auf 100 % gesetzt (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=10$, $*p<0,05$ bezüglich der Kontrollgruppe)

Um die in den Permeabilitätsstudien beobachtete Beteiligung von Akt zu belegen, sollte die Phosphorylierung von Akt, die die Aktivierung bewirkt, mittels Western Blot Analysen gezeigt werden. Es wurde dazu ein Antikörper verwendet, der spezifisch die phosphorylierte Form von Akt bindet. Für die Untersuchung wurden konfluente CSG-Monolayer für 60, 90 und 180 Minuten mit VEGF und PlGF sowie in Hypoxie behandelt.

Die Ergebnisse belegten eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung von Akt nach Behandlung mit VEGF und PlGF sowie unter hypoxischen Bedingungen. Während VEGF und PlGF die Phosphorylierung von Akt im Vergleich zur Kontrollgruppe annähernd verdoppelten, bewirkte die Hypoxie fast eine Vervierfachung (Abb. 29).

Es zeigte sich weiterhin, dass die Zunahme der Phosphorylierung unter Hypoxie in Gegenwart eines neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF drastisch reduziert wurde, jedoch nicht vollkommen aufgehoben werden konnte (Abb. 30). Es scheinen also noch andere Faktoren, die unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert werden, eine Phosphorylierung von Akt zu bewirken. Die Ergebnisse entsprachen damit den Beobachtungen der Permeabilitätsstudien.

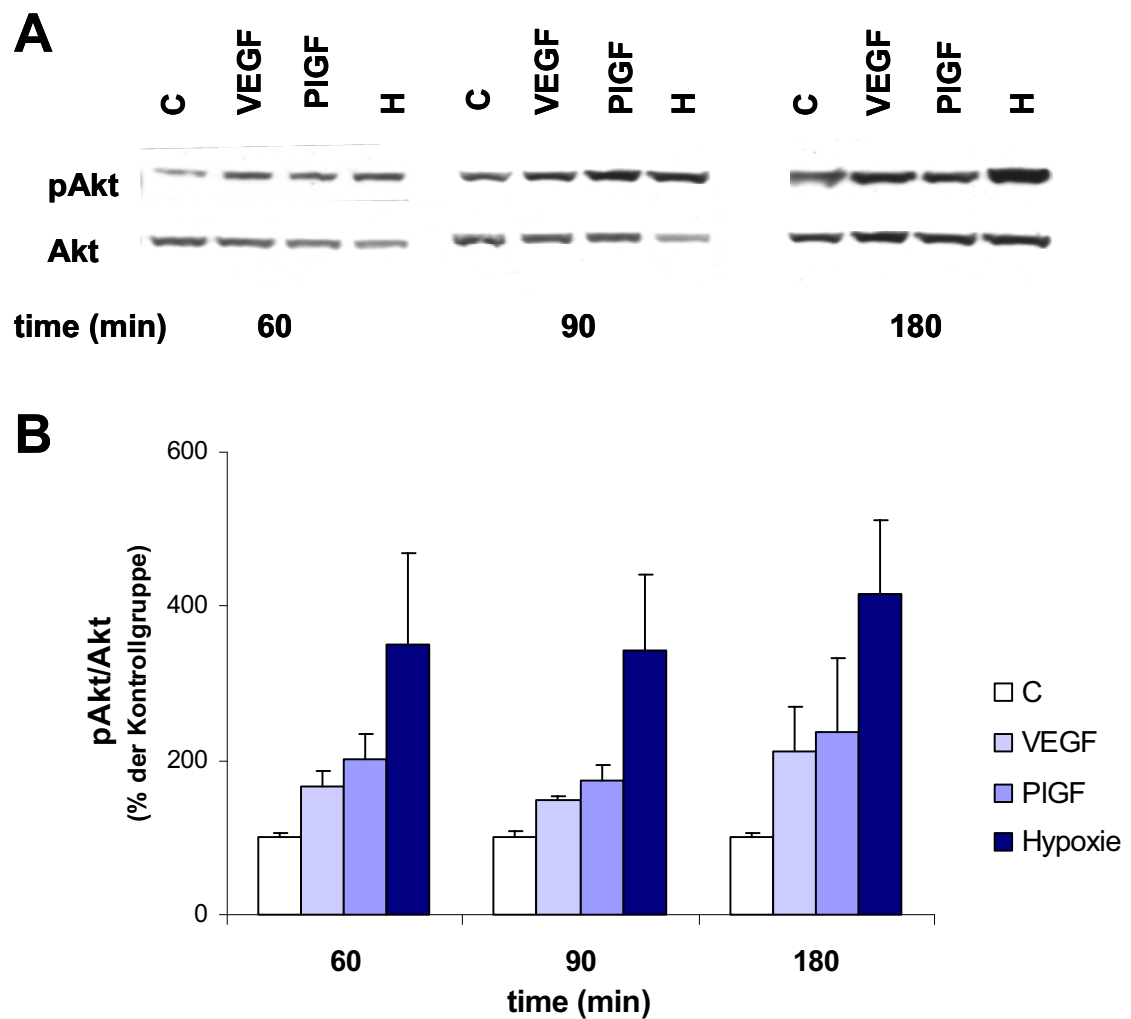


Abbildung 29: VEGF-, PlGF- und Hypoxie-induzierte Aktivierung von Akt.

A: Die CSG-Zellen wurden für 60, 90 und 180 min mit VEGF (10ng/ml), PlGF (10ng/ml) und Hypoxie behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Total-Protein-Lysat mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Mittels Western Blot Analyse wurde dann die Phosphorylierung von Akt analysiert. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen Akt und pAkt verwendet.

B: Quantifizierung der Akt-Phosphorylierung. Die Intensitäten der Western Blot Banden von pAkt und Akt zum gleichen Zeitpunkt und nach gleicher Behandlung wurden dividiert. Die Quotienten wurden mit der Kontrollgruppe (Normoxie, keine Zugabe von Agenzien) verglichen. Die Werte geben die Mittelwerte \pm SEM an. Die Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (n=4)

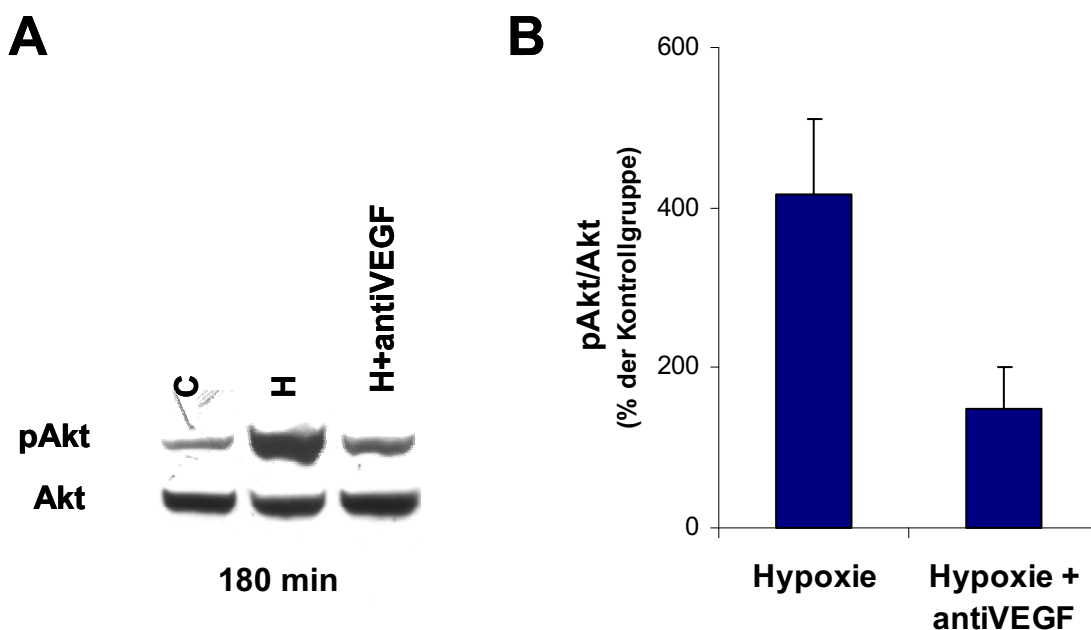


Abbildung 30: Hemmung der Hypoxie-induzierten Phosphorylierung von Akt durch einen neutralisierenden Antikörper gegen VEGF (antiVEGF).

A: Die CSG-Zellen wurden für 180 min unter Normoxie und Hypoxie in An- und Abwesenheit eines neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF (antiVEGF 10µg/ml) behandelt.

B: Quantifizierung der Akt-Phosphorylierung. Die Werte geben die Mittelwerte \pm SEM an. Die Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (n=4)

3.6 Zytotoxizitätstest

Um auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen der an den Epithelzellen gemessenen Permeabilität unter den oben genannten Behandlungen nicht auf zytotoxischen Effekten beruhen, wurden Zytotoxizitätstests wie in Kapitel 2.7 beschrieben durchgeführt.

Wie in Abbildung 31 ersichtlich, übt weder die Hypoxie (H) noch die Zugabe der verschiedenen Agenzien einen zytotoxischen Effekt auf die CSG Zellkultur aus. DMSO wirkt in einer Konzentration >10% als Zellgift und wurde hier als Positivkontrolle verwendet²²⁸.

Auch bei den CPE-Zellkulturen übt weder Hypoxie (H) noch die Zugabe von antiVEGF (10µg/ml) oder sFlt (100ng/ml) einen zytotoxischen Effekt aus.

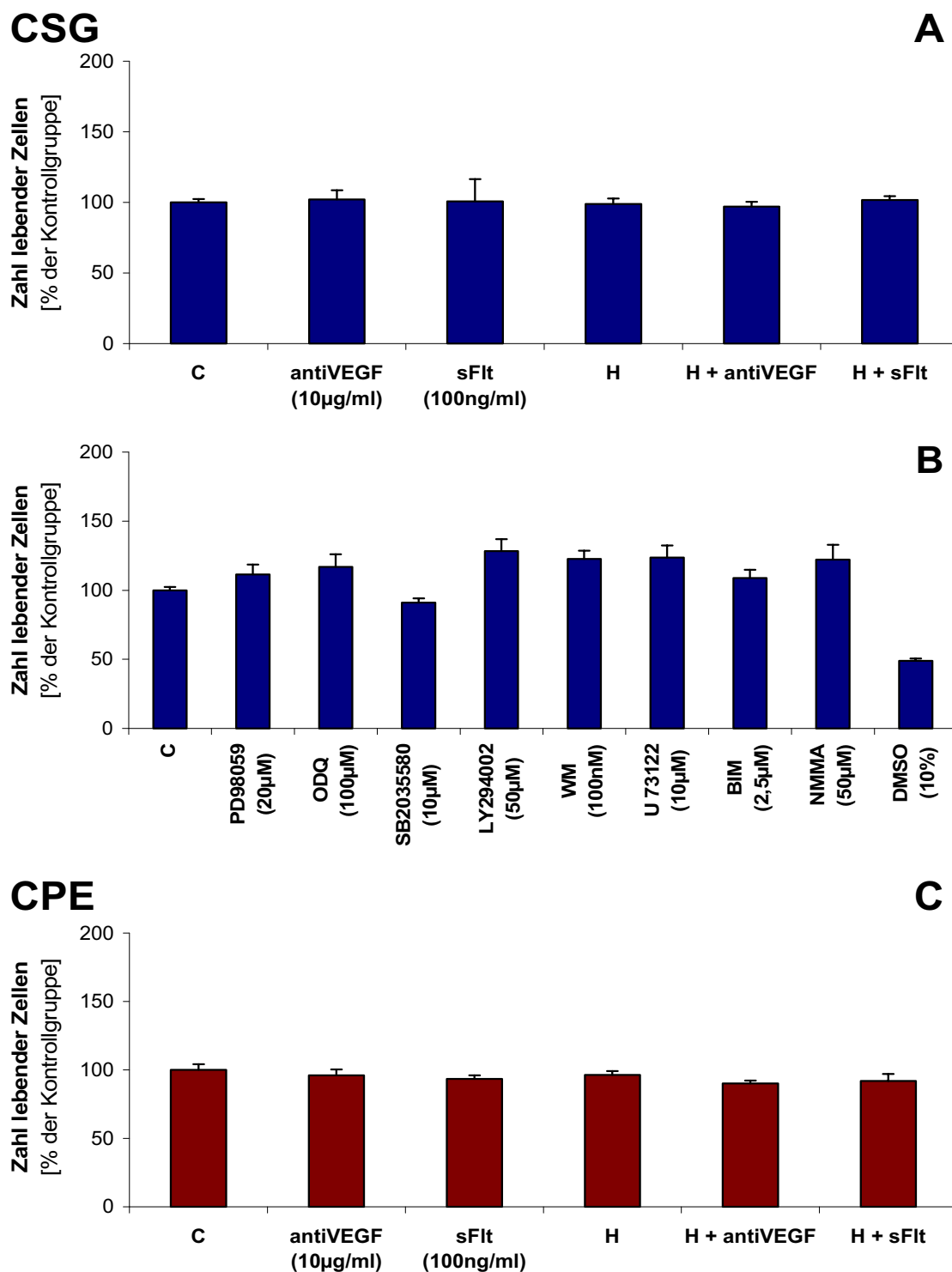


Abbildung 31: Zytotoxizitätstest.

A und B: Die CSG-Zellen wurden auf 96well Platten ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz im Brutschrank kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Agenzien zum Nährmedium.

C: CPE-Zellen wurden auf Laminin beschichteten 96well Platten ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die entsprechende Behandlung. Nach 24 Stunden wurde die Anzahl lebender Zellen wie unter 2.7 beschrieben durch Messung der Absorption bei 490 nm bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe (C) wurden auf 100% gesetzt (n=8).

3.7 VEGF-induzierte Proliferation

An Endothelzellen induziert VEGF neben der Steigerung der Permeabilität auch eine Proliferation der Zellen. Dieser biologische Effekt wird nach vorherrschender Meinung durch den p42/44 MAPK/ERK_{1/2}-Signaltransduktionsweg vermittelt. Einige Autoren sprechen jedoch auch der Aktivierung des PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweges die Vermittlung von proliferativen Effekten zu¹⁸⁸.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass VEGF durch Bindung und Aktivierung von Flt-1 an den CSG-Zellen die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt bewirken kann, sollte nun überprüft werden, ob dieses Signaling auch einen proliferativen Effekt in CSG-Zellen ausübt.

Die Analyse erfolgte durch die Messung der [³H]-Thymidin-Inkorporation sowie mit Hilfe des CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben.

3.7.1 [³H]-Thymidin-Inkorporation

Man erkennt unter der Zugabe von FCS eine deutliche Zunahme des eingebauten [³H]-Thymidins gegenüber der Kontrollgruppe, welche ohne die Zugabe von Agenzien behandelt wurde. Eine Proliferation der Zellen konnte also durch den Versuchsaufbau tatsächlich bestimmt werden. Der fehlende Anstieg bei einer Erhöhung der FCS-Konzentration nach 48h ist durch zu dichtes Wachstum der Zellen zu erklären. Insgesamt konnte eine zu dichte Aussaat der Zellen bei Versuchsbeginn damit ausgeschlossen werden.

Weder die Zugabe von VEGF noch von PLGF bewirkte an den CSG-Zellen eine Zunahme der durch diese Methode messbaren Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 32).

3.7.2 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Wie beim vorangegangenen Test zeigte sich auch hier nach Zugabe von FCS in verschiedenen Konzentrationen eine Zunahme der Proliferation. Im Gegensatz zur Messung der [³H]-Inkorporation zeigte sich hier jedoch auch eine Zunahme der Proliferation nach Zugabe von VEGF und PLGF gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 33).

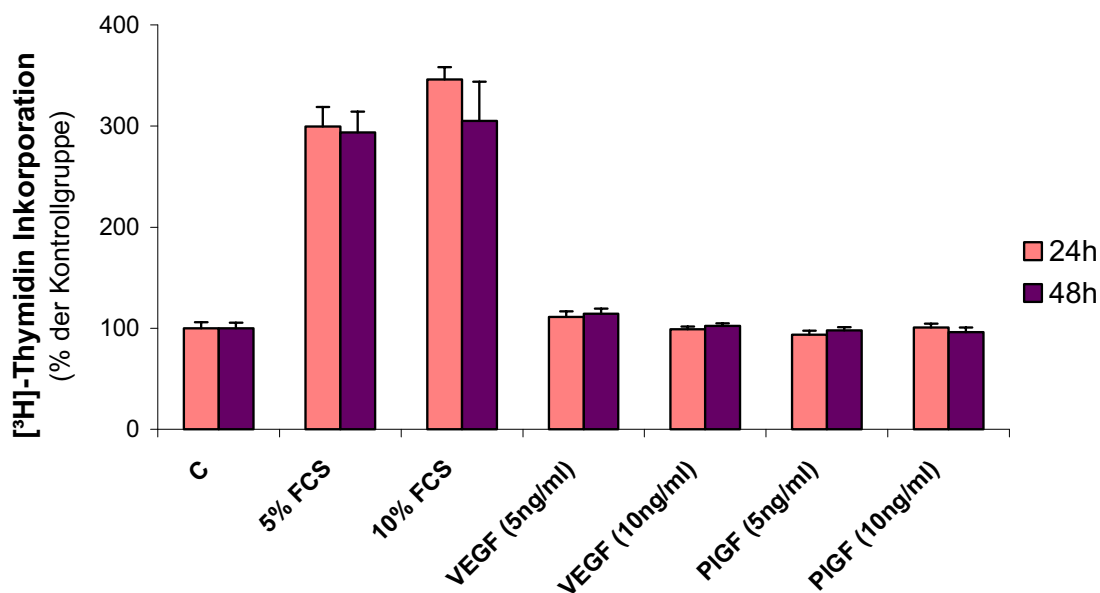


Abbildung 32: Messung der Proliferation von CSG-Zellen durch Bestimmung des eingebauten $[^3\text{H}]$ -Thymidins.

Die Zellen wurden auf 96well Platten ausgesät und für insgesamt 72h inkubiert. Nach Zugabe von VEGF (5 und 10ng/ml) und PlGF (5 und 10ng/ml) erfolgte die weitere Inkubation für 24h und 48h. Zur Bestimmung der $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation wurden die Zellen mehrfach gewaschen und anschließend mit dem Filtermate Harvester geerntet. Nach Zugabe einer Szintillationslösung wurde mit Hilfe des TopCount NXT™ die $[^3\text{H}]$ -Konzentration bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe wurden auf 100% gesetzt (n=6).

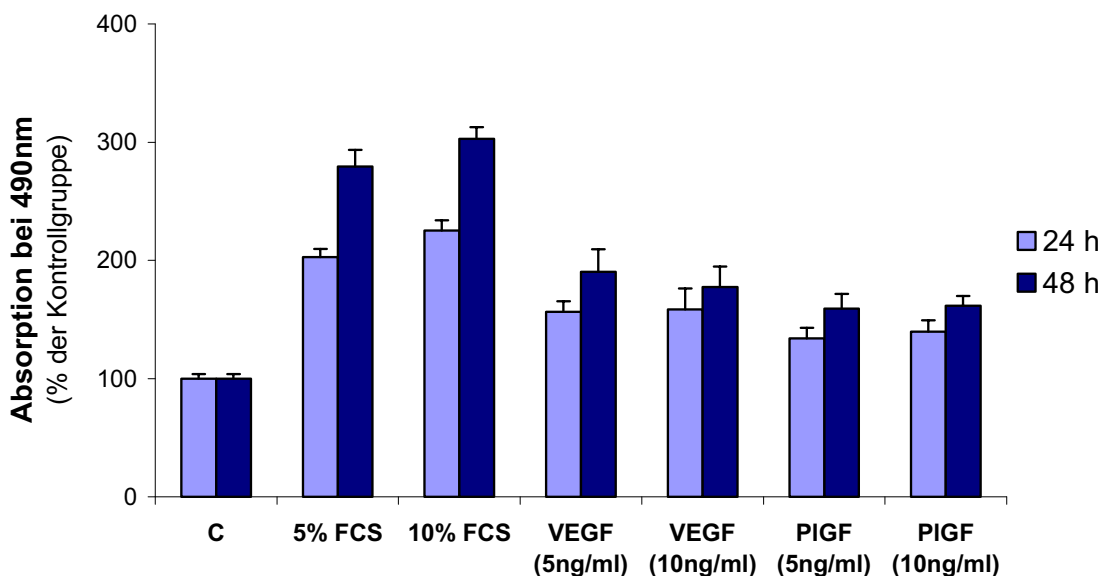


Abbildung 33: Messung der Proliferation mit dem CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

Die Zellen wurden auf 96well Platten ausgesät und für insgesamt 72h inkubiert. Nach Zugabe von VEGF (5 und 10 ng/ml) und PlGF (5 und 10 ng/ml) erfolgte die weitere Inkubation für 24h und 48h. Für die Auswertung wurden je well 20 μl der MTS-Farblösung hinzugefügt und nach 2h die Absorption im Photometer bei 490nm gemessen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe wurden auf 100% gesetzt (n=6).

Dieser scheinbare Widerspruch der beiden Versuche lässt sich jedoch durchaus in Einklang bringen, wenn man die beiden Prinzipien der Bestimmung vergleicht. Während bei der Messung der $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Inkorporation die Menge an neu synthetisierter DNA bestimmt wird, misst der CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay die Reduktion von MTS. Diese Reduktion ist NADH/H^+ bzw. NADPH/H^+ abhängig und kann damit durch Veränderungen des Metabolismus der Zellen beeinflusst werden.

4. Diskussion

Die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität von Endothelzellen wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Man sieht in ihr unter anderem die Ursache in der Entstehung des vasogenen Hirnödems bei Hypoxie¹⁰² oder Ischämie²²⁹ sowie bei Tumoren²³⁰. Eine Reihe von wissenschaftlichen Ergebnissen deutete dabei auf eine entscheidende Rolle von VEGF bei der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität hin. So konnten Fischer et al. am *in vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke zeigen, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität von BMEC (porcine brain microvascular endothelial cells) in autokriner Weise VEGF vermittelt ist. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Bindung von VEGF an seine spezifischen Rezeptoren der Zellmembran eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) sowie des Phosphoinositide-3-Kinase/Akt (PI3-K/Akt) Signalweges bewirkt. Hierdurch kommt es zur Erhöhung der Aktivität der NO-Synthase (NOS) und Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Durch Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF waren diese Effekte unterdrückbar⁷⁸. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegen diese Aussagen¹²⁴.

Trotz der intensiven Forschung der letzten Jahre auf dem Gebiet der Hypoxie- und VEGF-induzierten Hyperpermeabilität wurde der genaue Mechanismus, bzw. die sich nach VEGF Bindung an Flt-1 oder Flk-1 induzierte Signaltransduktion bisher nicht abschließend geklärt. Besonders die Frage der beteiligten VEGF-Rezeptoren wird kontrovers diskutiert. So bindet VEGF an Flt-1, Flk-1 sowie die Korezeptoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2²⁴. Alle dieser Rezeptoren werden auf Endothelzellen, aber auch auf einer Reihe anderer Zellarten exprimiert^{231,232}. Eine Reihe von Autoren halten Flk-1 für den entscheidenden Rezeptor in der Signaltransduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität^{233,234,235}. Grundlage hierfür waren ihre Forschungsergebnisse an *in vivo*-Modellen, wobei unterschiedliche Subtypen von VEGF (VEGF, PlGF, VEGF-C und Mutanten von VEGF-C) verwendet wurden. Becker et al. halten den Rezeptorkomplex aus Neuropilin-1 und Flk-1 für den Vermittler der vaskulären Hyperpermeabilität²³⁶. Sie belegten ihre Aussage mit Ergebnissen von *in vitro*-Messungen der Permeabilität, hier gemessen als transendothelialer elektrischer Widerstand (TER). Nach Transfektion humaner Pulmonalarterien-Endothelzellen (HPAE) oder Schweineaorten-Endothelzellen (PAE) mit Flk-1 und/oder Neuropilin-1

wurde die Permeabilität durch VEGF nur nach Transfektion mit beiden Rezeptoren erhöht.

Dagegen wurde durch die Untersuchungen von Glass et al. gezeigt, dass Flt-1 der Rezeptor ist, der für die VEGF-induzierte Hyperpermeabilität verantwortlich ist¹⁷². Die Arbeitsgruppe verwendete für ihre Versuche *in vivo*-Modelle der Mesenterialgefäße von Fröschen und Ratten. In An- und Abwesenheit spezifischer Inhibitoren von Flt-1 und Flk-1 maßen sie nach Zugabe von VEGF die Permeabilität. Unter Zuhilfenahme eines Mutanten von VEGF, welcher nicht mehr an Flk-1 binden kann, zeigten Stacker et al. ebenfalls die Flt-1 Abhängigkeit der VEGF-induzierten Hyperpermeabilität am *in vivo*-Modell¹⁷³. Weiterhin wiesen Odorisio et al. an *in vivo*-Modellen von transgenen Mäusen, welche PlGF überexprimierten, eine Erhöhung der Vaskularisation und der vaskulären Permeabilität nach¹⁷⁴. Offensichtlich ist der Mechanismus Hypoxie- bzw. VEGF-induzierter Permeabilitätsveränderungen von der Art der verwendeten Endothelzellen (mikro- oder makrovaskulär) und der Herkunft der Zellen (Organ, Spezies) abhängig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jetzt, dass im *in vitro* Modell mikrovaskulärer Gehirndothellzellen (BMEC) Flt-1 der Vermittler der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität durch VEGF ist. Dies wurde dadurch gezeigt, dass erstens nach spezifischer Aktivierung von Flt-1 durch PlGF-1 die Permeabilität des Endothelzellmonolayer erhöht wurde, wohingegen die spezifische Aktivierung von Flk-1 durch VEGF-E zu keiner Veränderung der Permeabilität führte. PlGF-1 entsteht als Folge von alternativem mRNA Spleißen vom PlGF-Gen²³⁷. Im Gegensatz zu PlGF-2 bindet PlGF-1 nicht an Neuropilin-1¹⁷⁵. Dieser wiederum kann als Co-Rezeptor für VEGF eine Aktivierung von Flk-1 bewirken^{238,239}. Durch die Verwendung von PlGF-1 konnte also eine Aktivierung von Flk-1 über Neuropilin-1 ausgeschlossen werden. VEGF-E ist ein virales (Orf Virus) Homolog von VEGF, welches spezifisch Flk-1 und Neuropilin-1, aber nicht Flt-1 bindet. Zweitens wurde nach Vorinkubation der Zellen mit spezifischen AS-Oligonukleotiden gegen Flt-1, nicht jedoch gegen Flk-1 die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität gehemmt. AS-Oligonukleotide verhinderten die Translation der mRNA für Flt-1 und Flk-1, was durch Western Blot Analysen bestätigt wurde.

Die Erkenntnis, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität von BMEC durch eine Aktivierung von Flt-1 vermittelt wird, passt zu dem Ergebnis, dass Hypoxie zu einer

vermehrten Expression von Flt-1 führt¹⁵² und gleichzeitig die Bindung von VEGF an Flt-1 verstärkt wird⁷⁸.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von Flt-1 eine Hyperpermeabilität an Endothelzellen bewirken kann, stellte sich die Frage, ob die Anwesenheit von Flk-1 für die Flt-1 vermittelte Hyperpermeabilität notwendig ist.

Autiero et al. beschrieben 2003, dass eine Aktivierung von einem VEGF-Rezeptortyp über intra- und intermolekulare Veränderungen zur Aktivierung des anderen Rezeptors führen kann (intra- and intermolecular cross-talk). So könnte es nach Aktivierung von Flt-1 durch PlGF über intermolekulare Transphosphorylierung von Flk-1 zur Aktivierung von Flk-1-abhängigen Signaltransduktionswegen kommen. Zusätzlich besteht nach Waltenberger et al. die Möglichkeit einer Bildung von Heterodimeren der beiden VEGF-Rezeptoren^{144,240}. Hierdurch wäre dann eine Zuordnung der einzelnen Funktionen in der Signalvermittlung von VEGF weiter erschwert.

Endothelzellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen beide VEGF-Rezeptoren. Eine Möglichkeit, die Rezeptorabhängigkeit der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität an Endothelzellen zu untersuchen, wäre die Verwendung geeigneter Endothel-Zelllinien, die nur einen der VEGF Rezeptoren oder einen strukturell veränderten, nicht mehr funktionstüchtigen Rezeptor, exprimieren. Alle bisher etablierten Zelllinien weisen jedoch nur geringe transendotheliale Widerstände auf und sind daher für Permeabilitätsstudien ungeeignet. Eine Reihe von Studien zeigte bereits, dass die VEGF-Rezeptoren auch auf nicht-Endothelzellen nachweisbar sind^{134,135}. Vor allem, aber nicht nur, auf Tumorzellen konnten die Rezeptoren nachgewiesen werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Zellen wie Endothelzellen VEGF exprimieren können. Weiterhin bilden verschiedene Epithelzellen *in vivo* und *in vitro* Zellmonolayer. Sie sind dabei genau wie Endothelzellen, die ja eine spezialisierte Form der Epithelzellen darstellen, durch Adherens Junctions und Tight Junctions miteinander verbunden, da auch Epithelzellen eine Barrierefunktion wahrnehmen. Die Proteine der interzellulären Verbindungen, die die hohen Widerstandswerte und niedrigen Permeabilitätswerte dieser Zellen bewirken, sind dabei überwiegend die gleichen wie bei den Endothelzellen^{113,123,241}.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Choroid Plexus Epithelzellen (CPE), von denen bekannt war, dass sie Flk-1 exprimieren und VEGF sezernieren, auch Flt-1 exprimierten. Da diese primären Zellen ebenfalls hohe transendotheliale Widerstandswerte ausbildeten und der Aufbau der Tight Junctions dem der

Endothelzellen sehr ähnlich ist, waren Permeabilitätsveränderungen dieser Zellen gut mit denjenigen primärer BMEC vergleichbar. Die TER der CPE-Zellmonolayer lag mit Maximalwerten von $290\Omega/\text{cm}^2$ zwar deutlich unterhalb der TER der beiden Zelllinien (CSG $1690\Omega/\text{cm}^2$ und MDCK $2000\Omega/\text{cm}^2$), entsprach aber den Werten von Strazielle et al.²⁴². Ab Werten von $200\Omega/\text{cm}^2$ konnte also auch hier von konfluenten Tight Junction-bildenen Monolayern ausgegangen werden.

Daneben wurden die carcinoma submandibular gland cells (CSG-Zellen) der Maus sowie Madin-Darby canine kidney cells (MDCK-Zellen) für die Untersuchungen verwendet. Mittels RT-PCR und Northern Blot Analyse sowie Western Blot Analyse und Immunzytochemie konnte gezeigt werden, dass die CSG-Zellen lediglich Flt-1, die MDCK-Zellen hingegen keinen der beiden VEGF-Rezeptoren exprimierten. Deshalb waren die CSG-Zellen nun ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Anwesenheit von Flk-1 für die Flt-1-induzierten Permeabilitätsveränderungen notwendig ist.

Zur Messung der Permeabilität an den Epithelzellmonolayern wurde [^3H]-Inulin als Tracer verwendet. Die Passage von Inulin erfolgt auf parazellulärem Wege²¹¹. Da die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität via VEGF am Endothel zu Veränderungen im Bereich der Tight Junctions führte²⁴³, war Inulin also ein geeigneter Marker zur Feststellung einer VEGF-abhängigen Veränderung der Permeabilität.

Auf Grund der unterschiedlichen VEGF-Rezeptorexpression zeigten nur CSG- und CPE-Zellen, nicht jedoch die MDCK-Zellen, eine Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität, die durch die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF (antiVEGF) sowie durch Zugabe des VEGF-Rezeptor-1 in seiner löslichen Form (sFlt) annähernd vollständig aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität der CSG- und CPE-Epithelzellen auch in autokriner Weise über das VEGF/VEGF-Rezeptor System vermittelt wird, wie bereits für Endothelzellen gezeigt worden war⁷⁸. Bei den MDCK-Zellen, die keinen VEGF-Rezeptor exprimierten, führte die Hypoxie hingegen erwartungsgemäß zu keiner Veränderung der Permeabilität.

Untermuert wurden die Ergebnisse durch Verwendung von AS-Oligonukleotide an den CSG-Zellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität des CSG-Zellmonolayer durch spezifische AS-Oligonukleotide gegen Flt-1, aber nicht gegen Flk-1 verhindert werden konnte. Auf die Zugabe von

VEGF und PlGF-1 reagierten die CSG- und CPE-Zellmonolayer ebenfalls mit einer Hyperpermeabilität, und zwar in ähnlicher Ausprägung wie auf Hypoxie.

Bei den Stimulationen mit PlGF-1 oder VEGF wurde immer ein Antioxidans zugegeben, da die VEGF-induzierte Hyperpermeabilität über eine Aktivierung der Nitroxid-Synthase (NOS) mit konsekutivem Anstieg der intrazellulären NO-Konzentration vermittelt wird⁷⁹. Die Halbwertszeit von NO ist unter Normoxie sehr kurz, da NO mit molekularem Sauerstoff und Sauerstoffradikalen zu gleichen Anteilen reagiert, woraus Nitrit, Nitrat und Peroxynitrat entsteht^{244,245}. Die Reaktionsgeschwindigkeiten dabei sind sehr hoch. Durch die Zugabe eines natürlichen Antioxidans wie α -Liponsäure (α -LA) kann die Konzentration von Sauerstoffradikalen im Medium gesenkt werden, wodurch es zur Aktivierung des Second-Messenger-Weges durch NO kommen kann⁷⁸.

Neben der autokrinen Sekretion konnte also auch die externe Zugabe von VEGF einen Permeabilitätsanstieg bewirken. Wiederum zeigte sich beim MDCK-Monolayer erwartungsgemäß kein Anstieg der Permeabilität, da sie keinen VEGF-Rezeptor exprimierten.

Wie bereits erwähnt, zeigten verschiedene Studien an *in vivo*-Modellen die führende Rolle von Flt-1 bei der Signaltransduktion der VEGF-induzierten Hyperpermeabilität. Da jedoch in allen Studien eine Anwesenheit von Flk-1 vorlag, konnte seine Rolle bei der Signaltransduktion nicht hinreichend erklärt werden. Auch wenn keine direkte Aktivierung durch den Liganden stattfand, war eine intermolekulare Aktivierung über Flt-1, wie sie von Autiero et al. beschrieben wurde, möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nun, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität auch in Epithelzellen über das VEGF/VEGF-Rezeptorsystem vermittelt wird. Da die in dieser Arbeit verwendete epitheliale Tumor-Zelllinie CSG nachweislich Flk-1 nicht exprimiert, wird dabei die Hyperpermeabilität auch in Abwesenheit von Flk-1 durch Flt-1 vermittelt. Die Anwesenheit von Flk-1, und damit eine mögliche intermolekulare Aktivierung durch Flt-1, ist also nicht erforderlich für die Signaltransduktion.

Die über Flt-1 vermittelte Signaltransduktion der Hypoxie- und VEGF-induzierten Hyperpermeabilität

Vorangegangene Studien an *in vivo*²⁴⁶- und *in vitro*-Modellen²⁴⁷ zeigten bereits, dass die Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität in Endothelzellen durch Aktivierung des Phosphoinositide 3-Kinase/Akt (PI3-K/Akt) Signalweges vermittelt wird. So gelangen es Fischer et al. die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität durch Wortmannin und LY294002 zu blockieren¹¹⁹. Es wurden dabei wiederum primäre Gehirnendothelzellen verwendet, welche sowohl den Flt-1 als auch den Flk-1 exprimierten. Dadurch konnte letztlich jedoch nicht eindeutig geklärt werden, über welchen der beiden VEGF-Rezeptoren die Signaltransduktion vermittelt wird.

Ausgehend von den oben genannten Permeabilitätsstudien, erwiesen sich die CSG-Zelllinie als guter Kandidat für die Untersuchung der Signalwege der Flt-1 vermittelten Hypoxie- und VEGF-induzierten Hyperpermeabilität, da sie nur Flt-1 und nicht Flk-1 exprimierten.

Die Ergebnisse der Permeabilitätsstudien mit verschiedenen Hemmstoffen zeigten, dass auch bei der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität in Epithelzellen der PI3-K/Akt-Signalweg involviert ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der Nitroxid-Synthase (NOS) sowie der löslichen Guanylatzyklase (sGC) essentiell für die Entstehung der Hyperpermeabilität sind. Dahingegen waren weder die Phospholipase C (PLC), die Proteinkinase C (PKC) noch die p38 und p42/44 MAPK (mitogen-activated protein kinase) an der Signaltransduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität über Flt-1 beteiligt.

Die Tatsache, dass es sowohl durch Hypoxie als auch durch die Zugabe von VEGF bzw. PlGF-1 bei den CSG-Zellen zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Akt kam, untermauerte die Ergebnisse der Permeabilitätsstudien, und belegte so, dass der PI3-K/Akt-Signalweg in der Signaltransduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität involviert ist. Durch Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF unter hypoxischen Bedingungen ließ sich die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt deutlich senken, jedoch nicht vollständig aufheben. Dies lässt sich dadurch erklären, dass auch andere durch Hypoxie induzierte Faktoren, wie zum Beispiel IGF-1, ebenfalls eine Phosphorylierung von Akt bewirken können²⁴⁸. So bewirkt die Hypoxie induzierte Aktivierung von Akt durch IGF-1 eine vermehrte

Aktivität von hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α), welcher als Transkriptionsfaktor unter anderem die Transkription von VEGF stimuliert²⁴⁹. Die Beteiligung des PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweges an der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität konnte auch durch *in vivo* Versuche der Arbeitsgruppe belegt werden: Bekanntermaßen steigt die VEGF-Produktion in den Hirngefäßen unter systemischer Hypoxie mit Abnahme der O₂-Verfügbarkeit zunehmend an und führt dadurch zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität mit der Folge der Entstehung des Hirnödems¹⁰². Durch die Vorbehandlung der Tiere mit dem PI3-K/Akt-Inhibitor WM (45 μ g intraperitoneal) konnte die Erhöhung der vaskulären Permeabilität unter 24 stündiger Hypoxie (8% O₂) vollständig unterdrückt werden. An der Kontrollgruppe, welche unter Normoxie gehalten wurde, zeigte der Hemmstoff keine Wirkung auf die Permeabilität²⁵⁰. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Versuche bestätigten damit die Beobachtungen der *in vitro* Untersuchungen.

Bezüglich der Signalkaskade von Akt ist bekannt, dass Akt die endotheliale Nitroxid-Synthase (eNOS) durch Phosphorylierung von Serin-Resten (Ser1177) aktivieren kann^{251,252}. Außerdem kann Akt die Transkription der eNOS mRNA steigern²⁵³. Nach Aktivierung der eNOS kommt es zur vermehrten Umsetzung von L-Arginin in Citrullin, wobei NO freigesetzt wird²⁵⁴. NO kann neben einer Vasodilatation und einer Induktion der Angiogenese auch die Permeabilität beeinflussen⁷⁹. Weiter konnte gezeigt werden, dass NO die lösliche Guanylatzyklase (sGC) aktiviert und so zum Anstieg des cGMP-Spiegels im Zytosol führt²⁵⁵. Wu et al. zeigten, dass VEGF-NO-abhängige Permeabilitätsanstiege in Koronargefäßen über eine Aktivierung der Guanylatzyklase und die Induktion einer cGMP-abhängigen Proteinkinase (Proteinkinase G, PKG) ablaufen²⁵⁶. Entsprechend ist gezeigt worden, dass Agenzien, die in der Lage sind, den intrazellulären cGMP-Spiegel zu erhöhen, dadurch die Permeabilität in Kapillaren sowohl *in vivo*²⁵⁷ als auch *in vitro*²⁵⁸ erhöhen können.

Nach einer Stimulation durch VEGF können neben aktiviertem Akt jedoch auch andere Signalwege die NOS aktivieren. Guo et al. zeigten, dass es durch Bindung von VEGF an seine spezifischen Rezeptoren (Flt-1 und Flk-1) zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der Phospholipase C (PLC) kommt. Wie bei der Aktivierung der PI3-K findet auch hier die Aktivierung der PLC über eine Bindung im Bereich der SH2-Domäne statt²⁵⁹. Alternativ kann die PLC auch durch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI_(3,4,5)P₃), dem Produkt der PI3-K-abhängigen Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI_(4,5)P₂), aktiviert werden²⁶⁰. Die PLC spaltet

das Membranlipid $\text{PI}_{(4,5)}\text{P}_2$ zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3). IP_3 bewirkt eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration und durch direkte Bindung von DAG erfolgt dann die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC)²⁶¹.

Die aktivierte PKC kann nun Serin-Reste der NOS phosphorylieren und diese damit aktivieren. Andererseits bewirkt auch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration bereits eine Aktivierung der NOS⁷⁷. Zusätzlich zur Aktivierung der NOS kann die PKC durch direkte Phosphorylierung von Tight Junction-Proteinen, zum Beispiel ZO-1 und -2²⁶², sowie über Aktivierung der MAPK mit anschließender Freisetzung von Prostaglandinen die Permeabilität erhöhen²⁶³. Den Nachweis, dass VEGF über die PKC tatsächlich eine Hyperpermeabilität bewirken kann, erbrachten Cohen et al. nach Untersuchungen mit bovinen Pulmonalarterien-Endothelzellmonolayer²⁶⁴.

In den durchgeführten Untersuchungen konnten nun durch Inhibition der NOS (durch L- N^G -monomethyl Arginine citrate, NMMA) sowie der sGC (durch 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1, ODQ) die VEGF/Flt-1 vermittelte Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität am CSG-Zellmonolayer aufgehoben werden. Die Hemmung der PLC und der PKC vermochte hingegen nicht die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität zu verhindern.

Mit dem Zytotoxassaay konnte belegt werden, dass die hier verwendeten Hemmstoffe keine zytotoxischen Effekte auf die CSG-Zellen ausüben, die die Ergebnisse der Permeabilitätsstudien hätten verfälschen können.

Die genannten Ergebnisse zeigen, dass der Signalweg $\text{PI3-K/Akt} \rightarrow \text{NOS} \rightarrow \text{sGC}$ durch Flt-1 aktiviert werden kann und im Falle der epithelialen Tumorzelllinie CSG für die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität verantwortlich ist.

Sie zeigen weiterhin, dass die Aktivierung der NOS dabei ausschließlich durch Akt erfolgt. Eine Aktivierung der NOS durch die PKC und / oder durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, hervorgerufen durch die PLC, ist daran nicht beteiligt. Auch eine direkte Einwirkung der PKC auf die Tight Junction-Proteine scheint hier nicht vorzuliegen.

Dies lässt den Schluss zu, dass die Signalwege $\text{VEGF/VEGFR} \rightarrow \text{PLC} \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_i/\text{PKC} \rightarrow \text{NOS}$ und $\text{VEGF/VEGFR} \rightarrow \text{PLC} \rightarrow \text{PKC} \rightarrow \text{TJ-Protein-Phosphorylierung}$ nicht durch Flt-1 vermittelt werden. Gestützt wird diese These durch Versuche mit

monoklonalen Antikörpern gegen die beiden VEGF-Rezeptoren. Yoshiji et al. machten dabei für die Aktivierung des Signalweges über die PKC durch VEGF den Flk-1 Rezeptor verantwortlich²⁶⁵. Bestätigt wurden ihre Ergebnisse durch Kuo et al.. Nach Versuchen mit small interfering RNA (siRNA) an bovinen Aorten-Endothelzellen zeigten sie eine Aktivitätsabnahme der PKC durch Flk-1-siRNA²⁶⁶.

Schließlich konnte noch eine Involvierung der MAPK p38 und p42/44 in die Signaltransduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität bei den CSG-Zellen ausgeschlossen werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Fischer et al. nach Untersuchung an BMEC, bei denen ebenfalls weder die PKC noch die p38 und p42/44 MAPK an den Veränderungen der Permeabilität beteiligt sind¹¹⁹.

Die Hauptaufgabe der PI3-K/Akt Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wie VEGF ist nach vorherrschender Meinung die Vermittlung von antiapoptotischen Reizen und damit die Sicherung des Überlebens der Zellen^{267,268,269}. Dies geschieht unter anderem über eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung des proapoptotischen Proteins BAD (Bcl-2-Antagonist of Cell Death)²⁷⁰. Daneben kann über eine Aktivierung von PI3-K/Akt die Zellproliferation sowie die Angiogenese induziert¹⁸⁸ und die Aktivität von Schlüsselenzymen des Glukose- und Lipidstoffwechsel der Zelle reguliert werden^{271,272}.

Über welchen der beiden VEGF-Rezeptoren die Signalvermittlung hierbei abläuft, wird kontrovers diskutiert. So machen Cai et al. nach Untersuchung einer Primärkultur von bovinen mikrovaskulären Endothelzellen der Retina Flt-1 für die Aktivierung von PI3-K/Akt durch VEGF verantwortlich²⁷³ wohingegen Gerber et al. nach Untersuchungen an Endothelzellen der Nabelschnurvene Flk-1 als entscheidenden Rezeptor betrachten⁷⁴. Es scheint also, dass die VEGF-induzierte Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalweges in verschiedenen Zellarten über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt wird.

Ausgehend von den vorangegangenen Ergebnissen und der Erkenntnis, dass VEGF an der epithelialen Tumor-Zelllinie CSG den PI3-K/Akt-Signalweg aktiviert, sollte nun die proliferative und überlebensfördernde Wirkung von VEGF untersucht werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung mit dem CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay zeigten einen Anstieg der Absorption bei 490nm gegenüber der Kontrollgruppe nach Zugabe von VEGF oder PlGF zum Medium. Die Messung der [³H]-Thymidin-Inkorporation zeigte hingegen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Dieser scheinbare Widerspruch der beiden Ergebnisse lässt sich jedoch durchaus in

Einklang bringen, wenn man die Funktionsweisen der beiden Tests betrachtet. Bei der Messung der [^3H]-Thymidin Inkorporation wird letztlich die Menge von neu synthetisierter Nukleinsäure gemessen. Durch die Verwendung von Thymidin wird dabei speziell die de novo Synthese von DNA und nicht von RNA bestimmt. Die de novo Synthese von DNA ist ein essentieller Bestandteil im Rahmen der Zellproliferation, da die Zellteilung mit einer Verdopplung der DNA einhergeht. Der CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay beruht auf einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung lebender Zellen und basiert auf der Reduktion einer Tetrazolium-Komponente (MTS) zu einem farbigen, löslichen Formazan-Produkt. Diese Reduktion erfolgte durch vitale Zellen unter Verbrauch von NADH/H^+ oder NADPH/H^+ , welche in metabolisch aktiven Zellen gebildet werden.

Vor diesem Hintergrund lässt sich nun aus den Ergebnissen der Proliferationsstudien schließen, dass VEGF über die Aktivierung von Flt-1 an den CSG-Zellen keine Proliferation bewirkt, da eine Steigerung der DNA Synthese nicht gemessen werden kann. VEGF könnte aber über Flt-1 vermittelt zu einem gesteigerten Metabolismus der Zellen führen, der hier durch die vermehrte Reduktion von MTS durch NADH/H^+ und NADPH/H^+ bestimmt wird. Diese Ergebnisse passen zu der Beobachtung, dass Akt Schlüsselstellen der zellulären Stoffwechselleistung beeinflussen kann⁷⁶. So wird über Akt unter anderem die Expression und Aktivität von GLUT-1 (glucose transporter) reguliert, wodurch die Aufnahme von Glukose in die Zelle gesteigert wird²⁷⁴. Über eine Aktivierung der Hexokinase entsteht vermehrt Glucose-6-Phosphat, das dann in die Glykolyse eintreten kann²⁷⁵. Akt kann dabei über HIF-1 α die Expression von Schlüsselenzymen der Glykolyse regulieren^{276,277}. Daneben kann Akt die Gluconeogenese hemmen²⁷². Diese Steigerung der katabolen Stoffwechselleistung führt letztlich zur vermehrten Bereitstellung von NADH/H^+ und NADPH/H^+ .

Eine erhöhte Zellviabilität, die hier durch die vermehrte Bereitstellung der Energieträgern NADH/H^+ und NADPH/H^+ bestimmt wurde, kann also an der epithelialen Tumorzelllinie CSG ebenfalls durch VEGF vermittelt werden. Die Signaltransduktion erfolgt dabei über Flt-1, und dies auch in Abwesenheit von Flk-1. Eine Proliferation der Zellen wird hingegen nicht durch Flt-1 vermittelt.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die Mechanismen der Signaltransduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität durch VEGF zu erforschen. Speziell die Frage, welcher der VEGF-Rezeptoren für die Signalvermittlung verantwortlich ist, sollte dabei untersucht werden.

Am *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke, bestehend aus porcinen mikrovaskulären Gehirndothelzellen (BMEC) konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie- und VEGF-induzierte Hyperpermeabilität durch Aktivierung von Flt-1 vermittelt wird. So erhöhte die Zugabe von PlGF, das lediglich Flt-1 und nicht Flk-1 bindet, die Permeabilität in gleicher Weise wie VEGF, wohingegen VEGF-E, ein virales VEGF-Homolog, das Flk-1 und Neuropilin-1, aber nicht Flt-1 aktiviert, keine Effekte auf die Permeabilität der Endothelzellen hatte. Darüber hinaus konnte durch AS-Oligonukleotide gegen Flt-1, aber nicht gegen Flk-1, die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität der BMEC aufgehoben werden.

Da Endothelzellen beide VEGF-Rezeptoren exprimieren und die Verwendung von spezifischen Liganden oder Inhibitoren der Rezeptoren eine mögliche intermolekulare Aktivierung nicht auszuschließen vermag, sollten die Untersuchungen zusätzlich an einer Zelle durchgeführt werden, die nur Flt-1 exprimiert. Die Zellen sollten dabei in Form eines Monolayers wachsen und dabei dichte Tight Junctions ausbilden, die eine Permeabilitätsbarriere darstellen.

Neben Endothelzellen werden die VEGF-Rezeptoren auch auf verschiedenen Epithelzellen exprimiert, die ebenfalls durch Tight Junctions miteinander verbunden sind und deren Monolayer hoher Widerstandswerte aufweisen. Mittels RT-PCR und Northern Blot-Analyse sowie Western Blot und Immunzytochemie wurden verschiedene Epithelzellen hinsichtlich ihrer Expression von Flt-1 und Flk-1 untersucht. Die primären CPE-Zellen zeigten dabei eine Expression beider Rezeptoren, MDCK exprimierten keinen der Rezeptoren. Die epitheliale Tumorzelllinie CSG zeigte lediglich die Expression von Flt-1. Durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes konnte bei allen Epithelarten eine gute Ausbildung von Tight Junctions bestimmt werden.

Permeabilitätsstudien unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in An- und Abwesenheit eines neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF sowie unter Zugabe von

VEGF und PlGF zeigten, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität über VEGF durch Flt-1 in Abwesenheit von Flk-1 vermittelt werden kann. Die Ergebnisse konnten durch Versuche an den CSG-Zellen mit AS-Oligonukleotiden gegen Flt-1 und Flk-1 bestätigt werden.

Weitere Permeabilitätsstudien unter Verwendung spezifischer Inhibitoren der Signalkaskaden sowie Western Blot Analysen zeigten dann, dass die Hyperpermeabilität über eine Aktivierung des PI3-K/Akt→NOS→sGC-Signalweges zustande kommt. PLC, PKC sowie p38 und p42/44 MAPK waren an den Veränderungen der Permeabilität nicht beteiligt.

Da über den PI3-K/Akt-Signalweg auch proliferative und anti-apoptotische Reize vermittelt werden können, wurden Proliferationstests an den CSG-Zellen unter Zugabe von VEGF und PlGF-1 durchgeführt. Durch die Ergebnisse aus der Messung der [³H]-Thymidin-Inkorporation und einer kolorimetrischen Bestimmung konnte dann abgeleitet werden, dass die Aktivierung von Flt-1 in Abwesenheit von Flk-1 keine Proliferation der CSG-Zellen bewirkt, wohl aber zu einer Steigerung des Metabolismus der Zellen mit der Folge der vermehrten Bereitstellung der Energieträger NADH/H⁺ und NADPH/H⁺ führen kann.

Die Erkenntnisse dieser Dissertationsarbeit könnten hilfreich sein in der Entwicklung von Therapiestrategien bei der Behandlung des durch VEGF vermittelten Hypoxie- oder Tumor-bedingten vasogenen Hirnödems. Auch in der onkologischen Therapie kann davon profitiert werden, da bekannt ist, dass viele Tumore VEGF sowie die VEGF-Rezeptoren exprimieren und eine Aktivierung durch VEGF zu Tumorwachstum und Metastasierung führen kann.

6. Summary

The present dissertation studies the mechanism of signaltransduction for hypoxia-induced hyperpermeability via VEGF. In particular, it will be analyzed which of the VEGF-receptors is responsible for signal transmission.

An *in vitro* blood-brain barrier model consisting of porcine brain microvascular endothelial cells (BMEC) was used to show that Hypoxia- and VEGF-induced hyperpermeability is mediated by activation of Flt-1. Addition of the receptor-specific homolog placental growth factor, which binds Flt-1 but not Flk-1, increased endothelial permeability to the same extent as VEGF, whereas adding VEGF-E, a viral VEGF molecule from the orf virus family activating Flk-1 and neuropilin-1, but not Flt-1, did not show any effect. Furthermore, selective antisense oligonucleotides against Flt-1, but not Flk-1, inhibited hypoxia-induced permeability changes.

Since endothelial cells express both VEGF-receptors and due to the fact that using specific ligands or inhibitors of the receptors does not preclude an intermolecular crosstalk and activation of the receptors, it was necessary to perform these studies using cells, wick only express Flt-1. Furthermore, these cells have to form tight monolayers by connecting tight junctons between single cells, thus forming a permeability barrier. Besides endothelial cells, epithelial cells also express VEGF-receptors. Both epithelial and endothelial cells are connected through Tight Junctions whose tightness can be controlled in a comparable way.

Using RT-PCR, northern blot, western blot and immuncytochemistry analysis the expression of VEGF-receptors Flt-1 and Flk-1 was tested in several epithelial cells. It turns out that primary CPE cells express both receptors, while MDCK expresses none of them. The epithelial tumor cell line CSG only expresses Flt-1.

Further permeability studies under normoxic and hypoxic conditions, using the CSG only expressing Flt-1 in the absence and presence of neutralizing antibodies against VEGF as well as under a high concentration of VEGF and PIGF demonstrated that Flt-1 is sufficient to induce hyperpermeability by hypoxia and VEGF independently on the presence of Flk-1.

Moreover, it was demonstrated, that hyperpermeability, induced by hypoxia/VEGF, depends on activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3-K/Akt), nitric oxide synthase (NOS) or protein kinase G (PKG). Neither PLC, PKC, nor MAPK p38 or p42/44 were involved in those permeability changes.

Because the PI3-K/Akt pathway also transmits proliferative and anti-apoptotic stimuli, further proliferation studies with the CSG cells, adding VEGF and PlGF-1, were performed. Testing the [^3H]-thymidine incorporation and by using a colorimetric, non-radioactive assay, no cell-proliferation was measured, but increased levels of NADH/ H^+ and NADPH/ H^+ could be an indication of increased cell viability after activation of PI3-K/Akt by VEGF, mediated by Flt-1.

These results will be helpful to develop therapeutical strategies to prevent hypoxia/VEGF-induced hyperpermeability leading to vasogenic brain edema formation, without interfering with the beneficial angiogenic and neuroprotective effects of VEGF. Moreover, the findings of this research could be used when treating cancer, since it is well known that many tumors express VEGF or VEGF-receptors and that activation due to VEGF can cause growth of the tumor and its dissemination.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *American Journal of Roentgenology*. 1939;42;891–899.
- 2 Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. *Journal of the National Cancer Institute* 1945;6;73–85.
- 3 Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1948;68;137–180.
- 4 Greenblatt M, Shubik P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *Journal of the National Cancer Institute*. 1968;41;111–124.
- 5 Ehrmann RL, Knoth M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1968;41;1329–1341.
- 6 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeut implications. *New England Journal of Medicine*. 1971;285;1182–1186.
- 7 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219;983–985.
- 8 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;161;851–858.
- 9 Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264;20017–24.
- 10 Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246;1309–1312.
- 11 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246;1306–1309.
- 12 Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *British Journal of Haematology*. 2005;128;303–309.
- 13 Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO*. 1999;8;3801–3806.
- 14 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28;235–242.
- 15 Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2;573–583.
- 16 Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996;93;1493–1495.

- 17 Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J. The human gene for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266;11947–54.
- 18 Ferrara N. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*. 1997;18;4–25.
- 19 Whittle C, Gillespie K, Harrison R, Mathieson PW, Harper SJ. Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clinical Science*. 1999;97;303–12.
- 20 Lei J, Jiang A, Pei D. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF 183. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1444;400–6.
- 21 Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272;7151–8.
- 22 Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology*. 1991;5;1806–14.
- 23 Eming SA, Krieg T. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;11;79–86.
- 24 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB*. 1999;13;9–22.
- 25 Lopes FL, Desmarais J, Gevry NY, Ledoux S, Murphy BD. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDAR during the peri-implantation period in the mink. *Mustela vison. Biology of Reproduction*. 2003;68;1926–33.
- 26 Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267;26031–37.
- 27 Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;86;346–355.
- 28 Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;269;6271–74.
- 29 Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes- implication for normal and impaired wound healing. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270;12607–13.
- 30 Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor 1. *Endocrinology*. 1996;137;2262–68.
- 31 Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine upregulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Research*. 1997;57;5590–97.

- 32 Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. Sp 1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*. 1997;15;669-676.
- 33 Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271;736-741.
- 34 Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin 1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270;308-312.
- 35 Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*. 1996;120;944-947.
- 36 Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83;1342-47.
- 37 Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber H-P, Nguyen T-N, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine*. 1998;4;336-340.
- 38 Christenson LK, Stouffer RL. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *Endocrinology & Metabolism*. 1997;82;2135-42.
- 39 Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359;843-845.
- 40 Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998;95;15809-14.
- 41 Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygensensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269;4355-61.
- 42 Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology*. 2002;64;993-998.
- 43 Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270;1230-1237.
- 44 Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270;13333-40.
- 45 Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB*. 2002;16;1151-62.
- 46 Percy, MJ. A Gain-of-Function Mutation in the HIF2A Gene in Familial Erythrocytosis. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358: S. 162-168
- 47 Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294;1337-1340.

- 48 Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292;468-472.
- 49 Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001;292;464-468.
- 50 Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development*. 2002;16;1466-71.
- 51 Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277;26351-55.
- 52 Michiels C, Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP, Raes M. HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life*. 2001;52;49-53.
- 53 Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes & Development*. 2000;14;391-396.
- 54 Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626);671-4.
- 55 Songyang Z, Sheolson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*. 1993;72;767-778.
- 56 Kroll J, Waltenberger J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272;32521-27.
- 57 Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular & Molecular Life Sciences*. 2006;63;601-15.
- 58 Pedram A, Razandi M, Levin ER. Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;26722-28.
- 59 Doanes AM, Hegland DD, Sethi R, Kovesdi I, Bruder JT, Finkel T. VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;255;545-548.
- 60 Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA. Utilization of distinct signalling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275;5096-5103.
- 61 Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*. 2004;68;320-44.
- 62 Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*. 2001;22;153-83.

- 63 Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 2002;12;9-18.
- 64 Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;4220-26.
- 65 Lal BK, Varma S, Pappas PJ, Hobson RW, Duran WN. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvascular Research*. 2001;62;252-62.
- 66 Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Keys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994;372;739-746.
- 67 Holbrook NJ, Liu Y. Signaling events controlling the molecular response to genotoxic stress. *Exs*. 1996;77;273-88.
- 68 Yosimichi G, Nakanishi T. CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular signal regulated kinase (ERK). *European Journal of Biochemistry*. 2001;268;6058-65.
- 69 Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway. Activation and function. *Cell sign*. 2000;12;1-13.
- 70 Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*. 1997;15;2169-77.
- 71 Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttrop N, Clauss M. p38 MAP kinase-a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB Journal*. 2003;17;262-4.
- 72 Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(2);262-7.
- 73 Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2000;97(4);1749-53.
- 74 Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski , Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDAR activation. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(46);30336-43.
- 75 Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Letters*. 2000;477;258-62.
- 76 Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7);1261-74.
- 77 Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, Granger HJ. Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *American Journal of Physiology*. 1999;276;H535-42.

- 78 Fischer S, Clauss M, Wiesnet M, Renz D, Schaper W, Karliczek GF. Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. *American Journal of Physiology*. 1999;276:C812-20.
- 79 Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001;98(5);2604-09.
- 80 Nicosia R, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor and indulin-like growth factor stimulate angiogenesis in vitro. *American Journal of Pathology*. 1994;145;1023-29.
- 81 Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992;189;824-31.
- 82 Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* ion and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Archives of Ophthalmology*. 1996;114;964-70.
- 83 Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 1995;146;1029-39.
- 84 Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;196;1497-1506.
- 85 Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *Journal of Clinical Investigation*, 1999;103;159-165.
- 86 Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine*. 1995;1;1024-28.
- 87 Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Baatout S, Witzing A, Grosse J, Bauer J, Cogoli A, Faramarzi S, Derradji H, Neefs M, Paul M, Grimm D. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor. *Apoptosis*. 2006;11;749-64.
- 88 Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;13313-16.
- 89 Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;264;781-88.
- 90 Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2002;99;4349-54.

- 91 Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-A, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*. 1999;126:1149-59.
- 92 Guerrin M, Moukadir H, Chollet P, Moro F, Dutt K, Malecaze F, Plouet J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *American Journal of Physiology*. 1995;164:385-394.
- 93 Oberg-Welsh C, Sandler S, Andersson A, Welsh M. Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1997;126:125-132.
- 94 Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. Loss of HIF-2 and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature Medicine*. 2002;8:702-710.
- 95 Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *Journal of Neuroscience*. 1999;19:5731-40.
- 96 Poesen K, Lambrechts D, Van Damme P, Shibuya M, Nuydens R, Van Den Bosch L, Meert T, D'Hooge R, Sendtner M, Robberecht W, Carmeliet P. Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(42):10451-59.
- 97 Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87:3336-3343.
- 98 Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *Journal of Experimental Medicine*. 1990;172:1535-45.
- 99 Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood*. 2003;102:1515-24.
- 100 Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE, Donner DB. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *International Journal of Hematology*. 1995;62:203-15.
- 101 Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;193:1005-14.
- 102 Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced VEGF expression causes vascular leakage in the brain. *Brain*. 2002;125:2549-57.
- 103 Kosmidou I, Karmaliotis D, Kirtane AJ, Barron HV, Gibson CM. Vascular endothelial growth factors in pulmonary edema: an update. *Journal of Thrombosis & Thrombolysis*. 2008;25(3):259-64.
- 104 Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial-cells. *American Journal of Physiology*. 1998;18:L678-684.

- 105 Collins PD, Connolly DT, Williams TJ. Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 1993;109;195-199.
- 106 Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Chersesh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular Cell*. 1999;4;915-924.
- 107 Strickland LA, Jubb AM, Hongo JA, Zhong F, Burwick J, Fu L. Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumour endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF). *Journal of Pathology*. 2005;206;466-475.
- 108 Gumbiner BM. Breaking through the tight junction barrier. *Journal of Cell Biology*. 1993;123;1631-33.
- 109 Nagy Z, Peters H, Hüttner I. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmolar conditions. *Laboratory Investigation*. 1984;50;313-322.
- 110 Furuse M, Hirase T, Itoh M, Tsukita S. Occludin a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology*. 1993;123;1777-88.
- 111 Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *Journal of Cell Biology*. 1997;138;181-92.
- 112 Lum H, Malik A. Regulation of vascular endothelial barrier function. *American Journal of Physiology*. 1994;267;L223-241.
- 113 Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry & Cell Biology*. 2008;130(1);55-70.
- 114 DeJana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Experimental Cell Research*. 1999;252;13-19.
- 115 Esser S, Lampugnani MG, Corada M, DeJana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 1998;111;1853-65.
- 116 Cruz A, DeFouw LM, DeFouw DO. Restrictive endothelial barrier function during normal angiogenesis in vivo: partial dependence on tyrosine dephosphorylation of beta-catenin. *Microvascular Research*. 2000;59;195-203.
- 117 Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor- mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;15099-103.
- 118 Gilbert RE, Vranes D, Berka JL, Kelly DJ, Cox A, Wu LL, Stacker SA, Cooper ME. Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Laboratory Investigation*. 1998;78(8);1017-27.
- 119 Fischer S, Wiesnet M, Marti HH, Renz D, Schaper W. Simultaneous activation of several second messengers in hypoxia-induced hyperpermeability of brain derived endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2004;198(3);359-69.
- 120 Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(6);883-917.
- 121 Allingham MJ, van Buul JD, BurridgeK. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *Journal of Immunology*. 2007;179;4053-64.

- 122 Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science*. 2008;121(Pt13);2115-22.
- 123 Ebnet K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochemistry & Cell Biology*. 2008;130(1);1-20.
- 124 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*. 2004;25;581-611.
- 125 Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to ckit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1991;88;9026-30.
- 126 Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Research*. 1992;52;5738-43.
- 127 Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 1990;5;519-524.
- 128 Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 1997;124;2039-48.
- 129 Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, Connolly D, Stern D, Kao J. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*. 1993;81;2767-73.
- 130 Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;188;359-368.
- 131 Thakahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Mitarai T, Sakai O. Protein tyrosine kinase expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;209;218-226.
- 132 Fournier E, Birnbaum D, Borg JP. Receptors for factors of the VEGF family. *Bull Cancer*. 1997;84;397-403.
- 133 Bellamy WT. Vascular endothelial growth factor as a target opportunity in hematological malignancies. *Current Opinion in Oncology*. 2002;14;649-656.
- 134 Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, Mochizuki M, Morita J. Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;303;962-967.
- 135 Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Agular S, Miller JW, Adamis AP. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1999;40;2115-21.
- 136 Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81;3112-18.

- 137 Clubbs EA, Bomser JA. Glycitein activates extracellular signal-regulated kinase via vascular endothelial growth factor receptor signaling in nontumorigenic (RWPE-1) prostate epithelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2007;18(8);525-32.
- 138 Roberts JR, Perkins GD, Fujisawa T, Pettigrew KA, Thickett DR. Vascular endothelial growth factor promotes physical wound repair and is anti-apoptotic in primary distal lung epithelial and A549 cells. *Critical Care Medicine*. 2007;35(9);2164-70.
- 139 Karihaloo A, Karumanchi SA, Cantley WL, Venkatesha S, Kale S. Vascular endothelial growth factor induces branching morphogenesis/tubulogenesis in renal epithelial cells in a neuropilin-dependent fashion. *Molecular & Cellular Biology*. 2005;25;7441-48.
- 140 Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;31283-88.
- 141 Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;11197-204.
- 142 Davis-Smyth T, Presta LG, Ferrara N. Mapping the charged residues in the second immunoglobulin-like domain of the vascular endothelial growth factor/placenta growth factor receptor Flt-1 required for binding and structural stability. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;3216-22.
- 143 Tao Q, Backer MV, Backer JM, Terman BI. Kinase insert domain receptor (kDar) extracellular immunoglobulin-like domains 4-7 contain structural features that block receptor dimerization and vascular endothelial growth factor-induced signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276;21916-23.
- 144 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDAR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269;26988-95.
- 145 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 2003;299;708-710.
- 146 Corless CL, McGreevey L, Haley A, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *American Journal of Pathology*. 2002;160;1567-72.
- 147 Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumarr. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998;95;11709-14.
- 148 Errico M, Riccioni T, Iyer S, Pisano C, Acharya KR, Persico GM. Identification of placental growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279;43929-39.
- 149 De Falco S, Gigante B, Persico M. Structure and function of placental growth factor. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2002;12;241-246.
- 150 Meyer M, Clauss M, Lepple WA, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO Journal*. 1999;18;363-374.

- 151 Wise LM, Ueda N, Dryden NH, Fleming SB, Caesar C, Roufail S. Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278;38004–14.
- 152 Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDAR, is up-regulated by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272;23659-67.
- 153 Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDAR by hypoxia. *Circulation*. 1996;94;1647-54.
- 154 Wilting J, Birkenhäger R, Eichmann A, McCarthy JEG, Christ B, Weich HA. VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of the chorioallantoic membrane. *Developmental Biology*. 1996;176;76-85.
- 155 Hiratsuka S, Minova O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998;4;9349-54.
- 156 Gille H, Kowalski J, Yu L, Chen H, Pisabarro MT, Davis ST. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3 ϕ - kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO Journal*. 2000;19;4064–73
- 157 Ito N, Huang K, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cellular Signaling*. 2001;13;849–854.
- 158 Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, Claesson-Welsh L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2001;33;315–324.
- 159 Igarashi K, Isohara T, Kato T, Shigeta K, Uno I. Tyrosine 1213 of Flt-1 is a major binding site of Nck and SHP-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;246;95–99.
- 160 Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;23410–18.
- 161 Igarashi K, Shigeta K, Isohara T, Yamano T, Uno I. Sck interacts with KDAR and Flt-1 via its SH2 domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;251;77–82.
- 162 Cunningham SA, Waxham MN, Arrate PM, Brock TA. Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270;20254–57.
- 163 Cunningham SA, Arrate MP, Brock TA, Waxham MN. Interactions of FLT-1 and KDAR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;240;635–639.
- 164 Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Shibuya M. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region 610 S. Cébe-Suarez et al. Signaling by VEGF receptors of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;238;487–491.
- 165 Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376;66–70.

- 166 Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase in pathological angiogenesis. *Cancer Research*. 2001;61;1207–13.
- 167 Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Ballmer-Hofer K, Shibuya M, Collen D, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature Medicine*. 2003;9;936–943.
- 168 Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Medicine*. 2002;8;841–849.
- 169 Heil M, Clauss M, Suzuki K, Buschmann IR, Willuweit A, Fischer S, Schaper W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *European Journal of Cell Biology*. 2000;79(11);850-7.
- 170 Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*. 2005;104(2);427-38, 2005
- 171 Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF). *Oncogene*. 1995;10;135–147.
- 172 Glass CA, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic VEGF isoform VEGF165b transiently increases hydraulic conductivity, probably through VEGF receptor 1 in vivo. *Journal of Physiology*. 2006;572;243-57.
- 173 Stacker SA, Vitali A, Caesar C, Domagala T, Groenen LC, Nice E, Achen MG, Wilks AF. A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274;34884-92.
- 174 Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, Failla CM, Zambruno G. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *Journal of Cell Science*. 2002;115;2559-67.
- 175 Park J, Chen H, Winer J, Houck K, Ferrara N. Placenta growth factor: Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDAR. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269;25646-54.
- 176 Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggest a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1993;90;8915-19.
- 177 Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase in pathological angiogenesis. *Cancer Research*. 2001;61;1207–13.
- 178 Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDAR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;226;324-8.
- 179 Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1998;95;8795–8800.
- 180 Hornig C, Weich HA. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis*. 1999;3;33–39.

- 181 Luttun A, Carmeliet P. Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered? *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111;600–602.
- 182 Stillman IE, Karumanchi SA. The glomerular injury of preeclampsia. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(8);2281–84.
- 183 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376;62–66.
- 184 Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1993;90;7533–37.
- 185 Kendall RL, Rutledge RZ, Mao X, Tebben AJ, Hungate RW, Thomas K. Vascular endothelial growth factor receptor KDAR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274;6453–60.
- 186 Meadows KN, Bryant P, Pumiglia KM. VEGF induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276;49289–98.
- 187 Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf- MEKMAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*. 1999;18;2221–30.
- 188 Yu Y, Sato JD. MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. *Journal of Cellular Physiology*. 1999;178;235–46.
- 189 Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDAR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*. 2000;19;2138–46.
- 190 Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272;15442–51.
- 191 Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275;10661–72.
- 192 Lamalice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*. 2004;23;434–445.
- 193 Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research*. 1997;80;383–392.
- 194 Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2000;10;321–327.
- 195 Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh V, Fang GH, Dumont D. Expression of the fmslike tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic

- endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1995;92;3566–70.
- 196 Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*. 1998;282;946–949.
 - 197 Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer*. 1999;86;2406-12.
 - 198 Valtola R, Salven P, Heikkilä P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *American Journal of Pathology*. 1999;154;1381-90.
 - 199 Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO Journal*. 2001;20;4762-73.
 - 200 Wang JF, Zhang X, Groopman JE. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and its downstream signaling promote cell survival under oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279;27088-97.
 - 201 Crook RB, Kasagami H, Prusiner SB. Culture and characterisation of epithelial cells from bovine choroid plexus. *Journal of Neurochemistry*. 1981;37;845-854.
 - 202 Gath U, Hakvoort A, Wegener J, Decker S, Galla HJ. Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components. *European Journal of Cell Biology*. 1997;74:68-78.
 - 203 Mischeck U, Meyer J, Galla HJ. Characterization of gamma-glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. *Cell Tissue Research*. 1989;256:221-226.
 - 204 Kleinstück JA. Die Wirkung volatiler Anästhetika auf die Permeabilität eines in vitro Modells der Blut-Hirn-Schranke. *Dissertation Giessen 2003*, <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1098/>
 - 205 Wobben MA. Mechanismus Hypoxie-induzierter Permeabilitätsveränderungen am in vitro Modell der Bluthirnschranke. *Dissertation Giessen 2003*, <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1307/>
 - 206 Knowles MA, Franks LM. Ultrastructure and biological markers of neoplastic change in adult mouse epithelial cells transformed in vitro. *British Journal of Cancer*. 1978;37:603-11.
 - 207 Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *Journal of Cell Science*. 1999;112:1879-88.
 - 208 Husted RF, Welsh MJ, Stokes JB. Variability of functional characteristics of MDCK cells. *American Journal of Physiology*. 1986;250:C214-21.
 - 209 Gaush CR. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1966;122:931-935.
 - 210 Aijaz S, Sanchez-Heras E, Balda MS, Matter K. Regulation of tight junction assembly and epithelial morphogenesis by the heat shock protein Apg-2. *BMC Cell Biology*. 2007;8:49.

- 211 Milton S, Knutson V. Comparison of the function of the tight junctions of endothelial cells and epithelial cells in regulating the movement of electrolytes and macromolecules across the cell monolayer. *Journal of Cellular Physiology*. 1990;144:498-504.
- 212 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987;162:156-159.
- 213 Lambert KN, Williamson VM. Library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. *Nucleic Acids Research*. 1993;21:775-776.
- 214 Bown TA. Gentechnologie für Einsteiger. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*. 1993
- 215 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951;193:265-275.
- 216 Peterson GL. Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*. 1979;100:201-220.
- 217 van der Flier M, Stockhammer G, Vonk GJ, Nikkels PG, van Diemen-Steenvoorde RA, van der Vlist GJ, Rupert SW, Schmutzhard E, Gunsilius E, Gastl G, Hoepelman AI, Kimpen JL, Geelen SP. Vascular endothelial growth factor in bacterial meningitis: detection in cerebrospinal fluid and localization in postmortem brain. *Journal of Infectious Diseases*. 2001;183:149-53.
- 218 Green KJ, Parry DA, Steinert PM, Virata ML, Wagner RM, Angst BD, Nilles LA. Structure of the human desmoplakins. Implications for function in the desmosomal plaque. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:11406-11407.
- 219 DeLisser HM. Platelet endothelial adhesion molecule-1 (CD31). *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1993;184:37-45.
- 220 Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(7);5241-8.
- 221 Zhu T, Gu J, Yu K, Lucas J, Tsao R, Gibbons J, Ayral-Kaloustian S, Skotnicki J, Mansour T, Zask A. Pegylated wortmannin and 17-hydroxywortmannin conjugates as phosphoinositide 3-kinase inhibitors active in human tumor xenograft models. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006;49(4);1373-8.
- 222 Hildebrandt J, Plant TD, Meves H. The effects of bradykinin on K⁺ currents in NG108-15 cells treated with U73122, a phospholipase C inhibitor, or neomycin. *British Journal of Pharmacology*. 1997;120;841-850.
- 223 Sridhar J, Pattabiraman N. Synthesis and isozyme selectivity of small molecule protein kinase C inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2005;15(12);1691-1701.
- 224 Griffith OW, Kilbourn RG. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods in Enzymology*. 1996;268;375-92.
- 225 Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Molecular Pharmacology*. 1995;48;184-188.
- 226 Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. SB203580 is a specific inhibitor of MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters*. 1995;364;229-233.

- 227 Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(46):27489-94.
- 228 Sexton TJ. Cytotoxicity of DMSO as related to components of a turkey semen extender. In *Poultry Science*, 1977;58/1079:1034ff.
- 229 Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106:829-38.
- 230 Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1a and HIF-2a in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *American Journal of Pathology*. 2000;157:411-21.
- 231 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 2003;9:669-76.
- 232 Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998;92:735-745.
- 233 Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen DF, Sullivan A, Isner JM. Vascular endothelial growth-factor vascular-permeability factor enhances vascular-permeability via nitric-oxide and prostacyclin. *Circulation*. 1998;97:99-107.
- 234 Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDAR (VEGFR-2) - A reassessment using novel receptorspecific vascular endothelial growth factor mutants. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:3222-3230.
- 235 Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K. A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-c that has lost vascular endothelial growth-factor receptor-2 binding, activation, and vascularpermeability activities. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:6599-6602.
- 236 Becker PM, Waltenberger J, Yachechko R, Mirzapioazova T, Lee CG, Elias JA, Verin AD. Neuropilin-1 regulates Vascular Endothelial Growth Factor-mediated endothelial permeability. *Circulation Research*. 2005;96:1257-1265.
- 237 Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A, Cao Y. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1997;235:493-8.
- 238 Mamluk R, Gechtman Z, Kutcher ME, Gasiunas N, Gallagher J, Klagsbrun M. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:24818-25.
- 239 Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:22272-8.
- 240 Neagoe PE, Lemieux C, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:9904-12.
- 241 Knust E, Bossinger O. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science*. 2002;298:1955-9.

- 242 Strazielle N; Gherzi-Egea JF. Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(15);6275-89.
- 243 Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;140;947-959.
- 244 Rubbo H, Radi R, Rrujillo M. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation: Formation of novel nitrogencontaining oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;42;26066-75.
- 245 Kharitonov VG, Sundquist AR, Sharma VS. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269;5881-83.
- 246 Six I, Kureishi Y, Zhengyu L, Walsh K. Akt signaling mediates VEGF/VPF vascular permeability in vivo. *FEBS Letters*. 2002;532;67-69.
- 247 Suzuma K, Naruse K, Suzuma I, Takahara N, Ueki K, Aiello LP, King GL. Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via K_{DAR}, Flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-akt-dependent pathways in retinal vascular cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275;40725-31.
- 248 Brywe KG, Mallard C, Gustavsson M, Hedtjarn M, Leverin AL, Wang X, Blomgren K, Isgaard J, Hagberg H. IGF-1 neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3 β ? *European Journal of Neuroscience*. 2005;21;1489-1502.
- 249 Wang X, Deng J, Boyle DW, Zhong J, Lee WH. Potential role of IGF-1 in hypoxia tolerance using a rat hypoxic-ischemic model: activation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Pediatric Research*. 2004;55;385-394.
- 250 Vogel C, Bauer A, Wiesnet M, Preissner KT, Schaper W, Marti HH, Fischer S. Flt-1, but not Flk-1 mediates hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2007;212(1);236-43.
- 251 Fulton D, Gratton J, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399;597-601.
- 252 Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399;601-605.
- 253 Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *American Journal of Physiology*. 1998;274;H1054-8.
- 254 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Review*. 1991;43;109-142.
- 255 Knowles G, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends in Biochemical Sciences*. 1992;17;399-402.
- 256 Wu HM, Huang QB, Yuan Y. VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *American Journal of Physiology*. 1996;40;H2735-39.
- 257 Yuan Y, Granger HJ, Zawieja DC. Histamine increases vascular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade. *American Journal of Physiology*. 1993;264;H1734-39.

- 258 Joo F, Temesvai P, Dux E. Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: The role of cyclic GMP. *Brain Research*. 1983;278;165-174.
- 259 Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270;6729-33.
- 260 Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim SR, Kwon KS, Rhee SG. Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273;4465-9.
- 261 Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 1992;258;607-614.
- 262 Avila-Flores A, Rendon-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, Gonzalez-Mariscal L. Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochemical Journal*. 2001;360;295-304.
- 263 Glikli G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca^{2+} . *Biochemical Journal*. 2001;353;503-12.
- 264 Cohen AW, Carbajal JM, Schaeffer RC. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *American Journal of Physiology*. 1999;277;H2038-49.
- 265 Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Uemura M, Fukui H. Different cascades in the signaling pathway of two vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors for the VEGF-mediated murine hepatocellular carcinoma development. *Oncology Reports*. 2005;13;853-7.
- 266 Kou R, SenBanerjee S, Jain MK, Michel T. Differential regulation of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) revealed by RNA interference: interactions of VEGFR-1 and VEGFR-2 in endothelial cell signaling. *Biochemistry*. 2005;44;15064-73.
- 267 Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7;606-19.
- 268 Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research*. 2005;94;29-86.
- 269 Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274;16349-54.
- 270 Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular Cell*. 2000;6;41-51.
- 271 Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, Jin J, Harper JW, Ericsson J. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF-FBW7. *Cell Metabolism*. 2005;1;379-391.
- 272 Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature*. 2007;447;1012-6.

- 273 Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes*. 2003;52:2959-68.
- 274 Taha, C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A. Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274;33085–91.
- 275 Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*. 2006;25;4683–96.
- 276 Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Research*. 2004;64;3892–99.
- 277 Lum JJ, Bui T, Gruber M, Gordan JD, DeBerardinis RJ, Covello KL, Simon MC, Thompson CB. The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & Development*. 2007;21;1037–49.

8 Anhang

8.1 Verwendete Materialien

8.1.1 Geräte und sonstige Bedarfsgegenstände

Standardgerätschaften werden nicht gesondert aufgeführt.

A.L.F. DNA Sequencer	<i>Pharmacia LKB, Freiburg</i>
Autoklav, Varioklav, Typ 500	<i>H-P Labortechnik, München</i>
Bakterienschüttler Certomat HK	<i>B. Braun Biotech, Melsungen</i>
Betastrahlenszähler (β -Counter)	<i>Berthold, Bad Wildbad</i>
Brutschrank Cellstar	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Filmentwicklungsmaschine Optimax	<i>Beetz, Langen</i>
Filtermate Harvester	<i>Packard, Schwadorf, AU</i>
Fluoreszenzmikroskop	<i>Leica, Wetzlar</i>
Gene Genius BioImaging System	<i>Syngene, Cambridge, UK</i>
Hybridisierungsöfen	<i>Biometra, Göttingen</i>
Hybridisierungsröhren	<i>Biometra, Göttingen</i>
Kühlzentrifuge	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Liquid Scintillation Analyzer	<i>Packard, Schwadorf, AU</i>
Microflow	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Millicell Voltohmmeter	<i>Millipore, Eschborn</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Superior, Lauda-Königshofen</i>
pH-Meter	<i>Schott, Mainz</i>
PhosphorImager Storm 860, zugehörige Kassetten	<i>Molecular Dynamics, Freiburg</i>
Photometer:	
Biowave S2100	<i>WPA, Cambridge, UK</i>
Tecan Spektra	<i>Tecan, Crailsheim</i>
Präzisions-Küvetten aus Quarzglas	<i>Hellma, Nürnberg</i>
Thermocycler Gene Amp PCR 9600	<i>PerkinElmer, Weiterstadt</i>
TopCount NXT™	<i>Packard, Schwadorf, AU</i>
UV-Stratalinker 1800	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
UV-Transluminator (302 nm, mittelwellig)	<i>Herolab, Wiesloch</i>
Vac-Man® Laboratory Vakuum Manifold	<i>Promega, Mannheim</i>
Vakuum Konzentrat Speed Vac	<i>GMI, Clearwater, USA</i>
Vertikale Elektrophorese/Naßblotkammer	<i>Invitrogen, Groningen, NL</i>
Zentrifuge RC-5B mit Rotor GS-3	<i>Sorvall, Hanau</i>

8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Übliche Verbrauchsmaterialien werden nicht extra genannt.

3MM-Papier	<i>Whatman, Kent, UK</i>
96-Well-Platten	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
96-Well-Mikrotiterplatten	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Chromatographiepapier DE 81	<i>Whatman, Kent, UK</i>
Cryoröhrchen	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
ExpressHyb Hybridization Solution	<i>Clontech, Heidelberg</i>
Hyperfilm ECL	<i>Amersham, Freiburg</i>

Nitrozellulose-Membran Hybond ECL	<i>Amersham, Freiburg</i>
Nylon-Membran Duralon UV™	<i>Stratagene, Heidelberg</i>
Objektträger, 8 Kammer Lab-Tek	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Objektträger, Biocoat, Kollagen beschichtet	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
Petrischalen: 28 cm ² und 69 cm ²	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
Petrischalen Biocoat, Kollagen beschichtet	<i>Becton-Dickinson, Heidelberg</i>
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen	<i>Falcon, Le Pont de Claix, FR</i>
PCR-Reaktionsgefäße	<i>Biozym, Hess. Oldendorf</i>
Reaktionsgefäße: 0,5, 1,5 und 2,0 ml (Eppendorftube)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
SDS-Polyacrylamidgel, 6% Tris-Glycin	<i>Anamed, Darmstadt</i>
SDS-Polyacrylamidgel, 10% Bis/Tris	<i>Invitrogen, Groningen, NL</i>
Sterifilter	<i>Millipore, Eschborn</i>
Szintillationsröhrchen	<i>Fisher Scientific, Schwerte</i>
Transwell® Polyester und Polycarbonate Membranen	<i>Costa-Corning, Bodenheim</i>
UniFilter® - 96, GF/C	<i>PerkinElmar, Weiterstadt</i>
Zellschaber	<i>Greiner, Frickenhausen</i>

8.1.3 Chemikalien

Die üblichen Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Karlsruhe; Merck, Frankfurt am Main und Sigma, Deisenhofen bezogen und werden im weitem nicht extra aufgeführt.

Agar	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Amphotericin B	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
Ampicillin	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Aprotinin	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Ara-C (Cytosine β -D-Arabino-Furanoside)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Borsäure	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
BSA (Bovine Serum Albumin)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Collagen, Rat tail	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol)	<i>Molecular Probes, Leiden, NL</i>
Dextran	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Dextransulfat	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Dispase	<i>Roche, Mannheim</i>
DMSO (Dimethylsulfoxid)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
DMEM (Dulbecco's Mod. Eagle Medium)	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
DMEM/F-12 Nutrient Mix 1:1	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
DNA Probenpuffer (6x)	<i>Promega, Mannheim</i>
DTT (DL-Dithiothreitol)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Dynabeads® Oligo(dT) ₂₅	<i>Dynal Biotech, Oslo, Norwegen</i>
E. coli JM109 Competent Cells	<i>Promega, Mannheim</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth, Karlsruhe</i>
ExpressHyb Hybridisierungspuffer	<i>Clontech, Heidelberg</i>
FCS (Fetales Kälberserum)	<i>Greiner, Frickenhausen</i>
First-Strand Buffer (5x)	<i>Invitrogen, Groningen, NL</i>
Formamid, deionisiert	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
Gentamicin (50mg/ml)	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
L-Glutamin (200mM)	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
Glycerin	<i>Roth, Karlsruhe</i>

Guanidiniumthiocyanat	<i>Roth, Karlsruhe</i>
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine- N'-[2-ethanesulfonic acid])	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Insulin	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
[³ H]-Inulin (Tritium-markiertes Inulin)	<i>Amersham, Freiburg</i>
Kollagenase/Dispase	<i>Roche, Mannheim</i>
N-Lauryl-Sarcosylsarcosin	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Laminin	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
LE-Agarose	<i>Biozym, Hess. Oldendorf</i>
LiDS (Lithium dodecylsulfate)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
α-Liponsäure	<i>Merck, Frankfurt am Main</i>
M199 Medium	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
Microscint™ 0	<i>PerkinElmar, Weiterstadt</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
MES-SDS-Laufpuffer (20x)	<i>Invitrogen, Groningen, NL</i>
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Mowiol	<i>Hoechst, Frankfurt am Main</i>
Non-essential Amino Acids	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
Normal Goat Serum	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
NuPage-Transferpuffer (20x)	<i>Invitrogen, Groningen, NL</i>
α-[³² P]-dCTP	<i>Amersham, Freiburg</i>
γ-[³² P]-dATP	<i>Amersham, Freiburg</i>
Penicillin-Streptomycin	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Protein-A-Sepharose	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, USA</i>
Rainbow™ coloured protein mol. weight marker	<i>Amersham, Freiburg</i>
RNasin® RNase Inhibitor (40 U/μl)	<i>Promega, Mannheim</i>
RNA-Größen-Marker	<i>Promega, Mannheim</i>
Salmonsperma DNA (ssDNA)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
SeaKEM GTG Agarose	<i>Biozym, Hess. Oldendorf</i>
SDS (Sodium dodecylsulfate)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	<i>Invitrogen, Groningen, NL</i>
Szintillationscocktail Rotiszint Ecoplus	<i>Roth, Karlsruhe</i>
[³ H]-Thymidin, (methyl)- ³ H-Thymidin	<i>Amersham, Freiburg</i>
Triton X-100	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (10x)	<i>Anamed, Darmstadt</i>
Tris-Glycin-SDS-Transferpuffer (20x)	<i>Anamed, Darmstadt</i>
Trizma® Base (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethane)	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Trypsin/EDTA (0,25%)	<i>Gibco, Karlsruhe</i>
Tween-20	<i>Biorad, München</i>
Φ X 174 RF DNA / Hae III-Fragmente	<i>Promega, Mannheim</i>

8.1.4 Kits

CellTiter 96 [®] AQueous One Solution	
Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
ECL-Plus Kit	Amersham, Freiburg
DC Protein Assay	Biorad, München
pGEM [®] -T-Easy Vector Kit	Promega, Mannheim
rediprime II [™] , RandomPrime Labeling Kit	Amersham, Freiburg
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
Wizard Plus DNA Mini/Midiprep Purification System	Promega, Mannheim
UltraClean [™] 15 DNA Purification Kit	MoBio Lab, Solana Beach, USA

8.1.5 Lösungen

Wenn nicht anders vermerkt, wurde demineralisiertes Wasser als Lösungsmittel verwendet.

8.1.5.1 Lösungen für die Proteinanalyse

6 M Harnstoff-Puffer

6	M	Harnstoff
150	mM	NaCl
10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
5	mM	MgCl ₂
5	mM	EGTA
1	mM	DTT
1	mM	Benzamidine
0,2	mM	PMSF
0,1	%	Triton X-100

TBS (Tris Buffered Solution)

137	mM	NaCl
20	mM	Tris-HCl, pH 7,5

TBST (Tris Buffered Solution with Tween)

137	mM	NaCl
20	mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,1	%	Tween-20

Protein Lysis-Puffer

150	mM	NaCl
20	mM	Tris/HCl, pH 7,5
10	mM	EDTA
1	%	Triton X-100
10	%	Glycerin
1	mM	Na ₃ VO ₄
1	mM	PMSF
10	µg/ml	Aprotinin

Stripping-Puffer

62,5	mM	Tris-HCl, pH 6,7
100,0	mM	β-Mercaptoethanol
2	%	SDS

TBS (Tris Buffered Solution)

137	mM	NaCl
20	mM	Tris-HCl, pH 7,5

RNA-Probenpuffer

50,0	%	deionisiertes Formamid
10,0	%	MOPS
16,0	%	Formaldehyd, 37 %ig
6,7	%	Glycerol
0,5	%	10 % (w/v) Bromphenolblau

8.1.5.2 Lösungen und Nährmedien für zellbiologische Techniken

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)

137,0	mM	NaCl
5,4	mM	KCl
1,2	mM	Ca ₂ Cl • 2 H ₂ O
0,4	mM	KH ₂ PO ₄
0,3	mM	Na ₂ HPO ₄
0,5	mM	MgCl ₂ • 6 H ₂ O
0,4	mM	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
4,2	mM	NaHCO ₃
5,5	mM	D-Glukose

HBSS w/o Ca²⁺; w/o Mg²⁺

137,0	mM	NaCl
5,4	mM	KCl
0,4	mM	KH ₂ PO ₄
0,3	mM	Na ₂ HPO ₄
4,2	mM	NaHCO ₃
5,5	mM	D-Glukose

Earle-Salz

116,4	mM	NaCl
5,4	mM	KCl
0,9	mM	Na ₂ HPO ₄
0,8	mM	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
1,4	mM	Ca ₂ Cl • 2 H ₂ O
5,5	mM	D-Glukose

PBS (Phosphate Buffered Saline)

137,0	mM	NaCl
5,4	mM	KCl
7,4	mM	Ca ₂ Cl • 2 H ₂ O
1,5	mM	KH ₂ PO ₄

BMEC-Medium

		M199
20	%	FCS
2	%	Penicillin-Streptomycin
1	%	Amphotericin B

MDCK-Medium

		DMEM
10	%	FCS
1	%	Glutamin
1	%	Non-essential Amino Acids

CSG-Medium

		DMEM
10	%	FCS
2	%	Penicillin-Streptomycin

CPE-Medium

		DMEM/F12
10	%	FCS
2	%	Penicillin-Streptomycin
1	%	Amphotericin B
2	%	L-Glutamin
10	mM	HEPES
20	µM	Ara-C
5	µg/ml	Gentamicin
5	µg/ml	Insulin

8.1.5.3 Lösungen und Nährmedien für molekularbiologische Techniken

Guanidiniumpuffer

4	M	Guanidiniumthiocyanat
25	mM	Na-citrat, pH 7,0
100	mM	β-Mercaptoethanol
0,5	%	N-Lauryl-Sarcosylsarcosin

20x SSC

3,0	M	NaCl
0,3	M	Na-citrat, pH 7,0

10x TBE

1	M	Tris-HCl, pH 8,0
1	M	Borsäure
25	mM	EDTA

Lysispuffer für Dynabeads® Oligo(dT)₂₅

100	mM	Tris-HCl, pH 7,5
500	mM	LiCl
10	mM	EDTA
1	%	LiDS
5	mM	DTT

10x MOPS-Puffer

41,80	g/l	MOPS
4,10	g/l	Na-Acetat
3,72	g/l	EDTA

Waschpuffer A für Dynabeads®

Oligo(dT)₂₅

10	mM	Tris-HCl, pH 7,5
150	mM	LiCl
1	mM	EDTA
0,1	%	LiDS

Hybridisierungspuffer für Northern Blot

50	%	deionisiertes Formamid
10	%	Dextransulfat
1	%	SDS
1	M	NaCl
100	µg/ml	ssDNA

Waschpuffer B für Dynabeads®

Oligo(dT)₂₅

10	mM	Tris-HCl, pH 7,5
150	mM	LiCl
1	mM	EDTA

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

10	g/l	Pepton aus Casein tryptisch verdaut
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
60	mg/l	Ampicillin

RNA-Probenpuffer

50,0	%	deionisiertes Formamid
10,0	%	MOPS
16,0	%	Formaldehyd, 37 %ig
6,7	%	Glycerol
0,5	%	10 % (w/v) Bromphenolblau

LB-Platten

		LB-Medium
1,5	%	Agar

8.1.6 Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezie	Verdünnung für WB	Verdünnung für IH	Hersteller
Flt-1 (C-17), polyclonal	rabbit	1:200	1:50	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, USA</i>
Flk-1 (C-1158), polyclonal	rabbit	1:200	1:50	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, USA</i>
VEGF (147), polyclonal	rabbit	1:200		<i>Santa Cruz, Santa Cruz, USA</i>
ZO-1 (Z-R1), polyclonal	rabbit	1:1000	1:100	<i>Zymed, San Francisco, USA</i>
ZO-2 (Z54.PL), polyclonal	rabbit	1:1000	1:50	<i>Zymed, San Francisco, USA</i>
Occludin, polyclonal	rabbit	1:1000	1:100	<i>Zymed, San Francisco, USA</i>
Claudin-1 (JAY.8), polyclonal	rabbit	1:1000		<i>Zymed, San Francisco, USA</i>
β -Actin, Clone AC-15, monoclonal	mouse	1:5000		<i>Sigma, Deisenhofen</i>
α -smooth muscle Actin, monoclonal	mouse		1:100	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
von-Willebrand-Faktor, monoclonal	rabbit		1:200	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
PECAM-1 (C-20), polyclonal	goat		1:50	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, USA</i>
Desmoplakin, polyclonal	rabbit		1:100	<i>DPC Biermann, Bad Nauheim</i>
Akt, polyclonal	rabbit	1:1000		<i>New England Biolab, Frankfurt</i>
Phospho-Akt, polyclonal	rabbit	1:1000		<i>New England Biolab, Frankfurt</i>
anti-rabbit Ig HRP-konjugiert	goat	1:5000		<i>Amersham, Freiburg</i>
anti-mouse Ig HRP-konjugiert	rabbit	1:5000		<i>Dako, Glostrup, DÄ</i>
anti-rabbit Ig Cy ³ -konjugiert	goat		1:400	<i>Dianova, Hamburg</i>
anti-mouse Ig Cy ³ -konjugiert	goat		1:400	<i>Dianova, Hamburg</i>
anti-goat Ig Cy ³ -konjugiert	mouse		1:400	<i>Dianova, Hamburg</i>

8.1.7 Verwendete Primer

Die Primer wurden von der Firma MWG, Ebersberg bezogen.

Flt-1 forward: 5' – CTG CCA CTC TCA TTG TAA ACG – 3'

Flt-1 reverse: 5' – GAC AGT TTC AGG TCC TCT CC – 3'

Flk-1/KDR forward: 5' – GTT TGC AAG AAC TTG GAT GCT C – 3'

Flk-1/KDR reverse: 5' – CCT GGC AGG TGT AGA GGC C – 3'

8.1.8 Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg bezogen.

Flt-1-AS 5' – CAA AGA TGG ACT CGG GAG – 3'

Flk-1-AS 5' – GGA TAC CTA GCG CAA AGA – 3'

scr Flt-1 5' – AGC TAG GCA CGA GAG TGA – 3'

scr Flk-1 5' – AGA CAA TAA GGG CAT CCG – 3'

8.2 Abkürzungsverzeichnis

^3H	Tritium
α -LA	Alpha-Liponsäure
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
antiVEGF	monoklonaler Antikörper gegen VEGF
AS	Antisense
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CSG	Zelllinie aus Carcinomzellen der Submandibulardrüse
COX	Cyclooxygenase
DAG	1,2-Diacylglycerol
DAPI	4,6-diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flk-1	Fetal liver kinase
Flt-1	Fms-like tyrosine kinase
GC	Guanylatzyklase
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HRE	Hypoxia Response Elements
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Heat shock protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IL	Interleukin
kb	Kilo-Basen = 1000 Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton = 1000 Dalton
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDCK	Madin Darby canine kidney
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NMMA	L-N ^G -monomethyl Arginine citrate
NO	Stickstoffmonoxid, Nitroxid
NOS	Nitroxid-Synthase
NP	Neuropilin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline

PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PG	Prostaglandin
PH	Peckstrin-homology
PI	Phosphatidyl-Inositol
PIGF	Placenta Growth Factor
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sFlt-1	Soluble Flt-1
SH2	Src-homology 2
TBS	TRIS buffererd saline (TRIS gepufferte Salzlösung)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS/HCl	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
Tyr	Tyrosin
VE-Cadherin	Vascular endothelial Cadherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VHL	von-Hippel-Lindau
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
WM	Wortmannin
ZO-1/-2	Zonula occludens protein-1/-2
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die durch ihre wissenschaftlichen Ratschläge und mit moralischer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Möglichkeit, die Arbeit auf einem internationalen Kongress vorzustellen. Für die Begutachtung meiner Arbeit möchte ich ihm ebenfalls herzlich danken.

Frau Marion Wiesnet möchte ich für die Einweisung in die Laborarbeit, die vielen Tipps und Tricks, die ständige Offenheit für Fragen und die Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Versuche danken. Ich hatte stets Freude bei der Arbeit im Labor, woran sie maßgeblichen Anteil hatte.

Den Feinmechanikern Herrn Siegfried Langsdorf und Herrn Christof Bingel danke ich für die Bereitstellung und Pflege der Hypoxiekammer. Frau Petra Richter möchte ich für das Spülen der Laborgeräte und Entsorgen des Abfalls danken. Marianne Granz danke ich für die Hilfe bei der Sequenzierung.

Ina danke ich für ihre emotionale Unterstützung und das Verständnis für den hohen Arbeitsaufwand dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich für ihre große Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Silvia Fischer. Sie stellte mir das Thema bereit, hat mich in viele der Arbeitstechniken eingearbeitet und bot mir eine intensive Betreuung während der experimentellen Forschung. Vor allem danke ich ihr jedoch für das Korrekturlesen, die ständige Bereitschaft zur Diskussion und die andauernde Motivation, die Arbeit auch nach so langer Zeit zu Ende zu bringen.

10. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Schul Ausbildung

Universitäre Ausbildung und Prüfungen

Promotion:

Publikationen:

Vogel C, Bauer A, Wiesnet M, Preissner KT, Schaper W, Marti HH, Fischer S. "Flt-1, but not Flk-1 mediates hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway". *Journal of Cellular Physiology*. 2007;212(1);236-43.

Poster

Vogel C, Reinel A, Renz D, Schaper W, Fischer S. "Role of VEGF in hypoxia-induced hyperpermeability in epithelial cells", 5th Symposium on "Signal transduction in the blood-brain barriers", Potsdam 2002

Fischer S, Vogel C, Wiesnet M, Renz D, Schaper W. "Flt-1-mediated hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway", Kongress Bosten 2004

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

